

**Zur Kenntniss der Inhaltsstoffe
von Herba Herniariae**

Walter Probst

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Herba Herniariae

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Walter Probst
aus
München

Mai 1958

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1958

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	3
I. Bisherige Arbeiten über die Inhaltsstoffe von Herba Herniariae	3
II. Eigene Untersuchungen	4
<u>Über die Flavonglykoside von Herba Herniariae</u>	
1) Papierchromatographie von Gesamtauszügen	4
2) Isolierung der Flavonglykoside	6
a) Gewinnung eines chlorophyllfreien gereinigten Auszuges	6
b) Ausschüttelungsversuche	7
c) Gewinnung eines Mischkristallisats der Flavonglykoside I und II	7
d) Trennung des Mischkristallisats der Flavonglykoside I und II	8
e) Isolierung der Nebenflavonglykoside III und IV	9
3) Identifizierung der Flavonglykoside	12
a) Flavonglykosid I	12
b) Flavonglykosid II	18
c) Flavonglykosid III	20
d) Flavonglykosid IV	23
4) Übersicht über die in verschiedenen Herniariaarten vorkommenden Haupt- und Nebenflavonglykoside und ihre Verteilung in den einzelnen Pflanzenteilen	24
<u>Über die Cumarine von Herba Herniariae</u>	
1) Einleitung	26
2) Isolierung	26
a) Vorversuche	26
b) Extraktbereitung	28
3) Identifizierung	29

Über die Saponine von Herba Herniariae

1) Einleitung	33
2) Isolierung der Saponine	34
3) Papierchromatographie der Saponine	34
4) Nachweisreaktionen zur Charakterisierung des Saponins	35
5) Versuche zur Strukturaufklärung des Saponins und Sapogenins	36
C. Experimenteller Teil	45
1) Isolierung der Hauptflavonglykoside I und II ...	45
a) Extraktbereitung	45
b) Papierchromatographie	45
c) Darstellung eines Mischkristallisats der Fla- vonglykoside I und II	46
d) Trennung des Mischkristallisats	47
2) Isolierung der Nebenflavonglykoside III und IV .	50
3) Identifizierung der Flavonglykoside	53
a) Schmelzpunkte	53
b) Papierchromatographie	53
c) Hydrolysen	54
d) Azetylierung der Aglykone	58
e) Methylierung der Flavonglykoside I und II ...	58
f) Zirkon-Zitronensäuretest	59
g) UV-Spektren	60
h) IR-Spektren	60
4) Die Cumarine von Herba Herniariae	60
a) Isolierung der Cumarine	60
b) Identifizierung des Cumarins	61
5) Die Saponine von Herba Herniariae	62
a) Gewinnung des Saponins	62
b) Darstellung des Sapogenins	63
6) Papierchromatographie der Saponine und Sapoge- nine	64

7) Zur Konstitutionsaufklärung des Saponins und Sapogenins	65
a) Hämolyse	65
b) Farbreaktionen	66
c) Fällbarkeit mit Cholesterin	66
d) Prüfung auf Hämolyseaufhebung durch Cholesterin	66
e) Nachweis von Carboxylgruppen	67
f) Nachweis von Aldehydgruppen	67
g) Darstellung von Quillajassäure- und Herniariasapogeninazetat	67
h) UV-Spektren	67
i) IR-Spektren	67

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Uralt wie die Heilkunst ist das Wissen um die Heilkraft vieler Pflanzen. In der Frühzeit der Menschheitsgeschichte entsprach diesem "Wissen" noch eine dämonische Kraft, die in der Natur wirksam war und sich nach Gutdünken entfalten konnte. Erst nach und nach machte der Mensch Pflanzen zum Gegenstand seines Forschens und suchte nach Möglichkeiten, das Geheimnis ihrer Wirkung zu ergründen. Diesen Bemühungen galten die offenkundigen Bestrebungen eines Paracelsus, durch Sublimation, Kalzination u.a.m. die "Quinta Essentia", den eigentlichen Wirkstoff zu finden.

Erst der Neuzeit blieb es vorbehalten, durch Entwicklung moderner Methoden, wie der Chromatographie, Spektrophotometrie und Kolorimetrie, die wirksamen Pflanzenstoffe zu isolieren und zu identifizieren.

Damit ist die Beschäftigung mit den Arzneipflanzen zu einem Gebiet der exakten Forschung geworden. Ihre Aufgabe ist es, durch Aufklärung der Inhaltsstoffe und pharmakologische Untersuchungen die unkritische, nur auf Empirie beruhende Anhäufung von Anwendungsgebieten einzudämmen und ein wissenschaftlich begründetes Arzneibild zu erhalten. Sie führte dazu, daß heute zahlreiche Pflanzen ihre therapeutische Bedeutung verloren haben, weil sie keine Wirkstoffe enthalten, die eine praktische Anwendung rechtfertigt. Andererseits erlangen zahlreiche bisher in Vergessenheit geratene Arzneipflanzen neue Wertschätzung.

So hat zum Beispiel die Wiederentdeckung der Khella (Ammi visnaga) zu einer ausgedehnten chemischen und pharmakologischen Bearbeitung geführt. Während früher die Droge vorwiegend bei den Steinleiden in den abführenden Harnorganen verwendet wurde, ist sie jetzt nach Isolierung des eigentlichen Wirkstoffes das bewährte Mittel gegen Spasmen im Coronarsystem und in den Bronchien.

Als Beispiel dafür, daß die Isolierung der Hauptwirkstoffe nicht immer genügt, die Gesamtwirkung eines pflanzlichen Extraktes ganz erklären zu können, mag *Digitalis purpurea* gelten. Aus ihren Blättern konnte man im Laufe der letzten Jahre neben dem von Stoll in seinen klassischen Arbeiten gefundenen und strukturell aufgeklärten Herzglykosiden noch weitere Nebenglykoside isolieren, die sicherlich an der pharmakologischen Wirkung eines Auszuges beteiligt sein dürften. Nicht zuletzt sind es hier oftmals relativ indifferente Stoffe, wie die Saponine und Gerbstoffe, die durch Lösungsvermittlung bzw. Resorptionssteigerung manche Wirkung verstärken.

Ähnliche Feststellungen konnten in letzter Zeit auch bei einer Reihe anderer Pflanzen getroffen werden. Sie gaben Veranlassung, bisher nur unvollständig untersuchte Pflanzen eingehender auf das Vorkommen weiterer Wirkstoffe zu bearbeiten, um ein umfassendes Gesamtbild der Inhaltsstoffe zu erhalten.

Unter diesem Gesichtspunkt wurde mir die Aufgabe gestellt, *Herba Herniariae* auf seine Inhaltsstoffe zu untersuchen, diese zu isolieren und, soweit möglich, auch strukturell aufzuklären. Vielleicht konnten damit Anhaltspunkte für eine wissenschaftliche Erklärung der empirisch festgestellten diuretischen Wirkung der Droge gefunden werden.

A. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Arbeiten über die Inhaltsstoffe von Herba Herniariae

Die chemische Untersuchung des in der Volksheilkunde als Diureticum geschätzten Harn- oder Bruchkrautes begann vor etwa 100 Jahren als M. GOBLEY¹⁾ in der Pflanze ein 7-Oxycumarin nachwies, das er als Herniarin bezeichnete. Bei K. BARTH und L. HERZIG²⁾ finden wir eine Bestätigung dieser Angaben.

R. SCHNEEGANS³⁾ isolierte 1890 ein widerlich riechendes Alkaloid Paranychon, dem er auf Grund pharmakologischer Untersuchungen eine zentrallähmende Wirkung zuschrieb. Nach neueren Untersuchungen⁴⁾ ist jedoch die Existenz dieses Alkaloids fraglich.

Zu weiteren Inhaltsstoffen zählen die Saponine. Über ihr mengenmäßiges Vorkommen herrscht jedoch keine Klarheit, denn C. WEHMER⁵⁾ gibt einen Saponingehalt von 0,18-0,9% an, während F. DAEBLER⁶⁾ einen Gehalt von 3,4% findet.

F. DAEBLER⁶⁾ hält das Herniariasaponin auf Grund von Untersuchungen nicht für einheitlich und unterscheidet zwischen einem in größeren Mengen vorkommendem neutralen Saponin (ca. 3%) und einem in geringen Mengen enthaltenem sauren Saponin (ca. 0,4%). Das saure Saponin bezeichnete er als Herniariasäure.

Nach Angaben von F. BERGER⁴⁾ soll in der Droge außerdem ein festes ätherisches Öl vorkommen, dessen Konstitution nicht geklärt ist.

1) M. GOBLEY, J. Pharmac. Chim. 20, 270 (1874).

2) K. BARTH u. L. HERZIG, S.-B. österr. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl., Abt. IIb 98, 150 (1889).

3) R. SCHNEEGANS, J. Pharmaz. Elsaß-Lothringen (1890).

4) F. BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Wien 1952, Bd. IV, S. 262.

5) C. WEHMER, Die Pflanzenstoffe, Jena 1929, Bd. I, S. 305.

6) F. DAEBLER in R. KOBERT, Neue Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen, 1916, Bd. I, S. 65.

Drei Flavonglykoside, die nach der Hydrolyse die Aglykone Kämpferol und Quercetin liefern, wies R. COBET⁷⁾ auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen nach.

II. Eigene Untersuchungen

Jede Isolierungsarbeit beginnt im allgemeinen mit einer papierchromatographischen Untersuchung. Aus den auf dem Papierchromatogramm auftretenden Flecken, die am Tageslicht oder im UV-Licht, manchmal erst nach Besprühen mit verschiedenen Reagenzien sichtbar werden, läßt sich in zahlreichen Fällen bereits eine orientierende Übersicht der möglichen Pflanzeninhaltsstoffe geben.

1) Papierchromatographie der Gesamtauszüge

Bei der Chromatographie eines durch methanolische Extraktion im Soxhlet bereiteten und gereinigten Auszuges von *Herba Herniariae* konnten wir im Lösungsmittelsystem Essigester-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) folgende Feststellung treffen: Zwei auf dem Papierchromatogramm in mittlerer Höhe befindliche dunkle Zonen sind durch eine zwischen ihnen befindliche blaufluoreszierende Zone getrennt. Eine weitere, aber stärker blaufluoreszierende Zone konnten wir an der Lösungsmittelfront feststellen.

Die dunklen Zonen, die wir auf Grund verschiedener Farbreaktionen (z.B. basisches Bleiazetat) für Flavonglykoside hielten, trennten sich im Durchlaufchromatogramm wiederum in je zwei Zonen, so daß wahrscheinlich insgesamt vier Flavonglykoside in der Droge vorlagen. Nach ihrer Konzentration sollen sie in die Hauptglykoside I und II und die Nebenglykoside III und IV eingeteilt werden.

Die zwischen den Flavonglykosiden befindliche blaufluoreszierende Zone zeigte beim Besprühen mit Blutlösung Hämolyse und

7) R. COBET, Dissertation, München 1957.

erwies sich später als ein Saponin. Die mit der Lösungsmittelfront wandernde Zone fluoreszierte beim Besprühen mit äthanolischer Kalilauge intensiv blau und konnte durch spätere Untersuchungen zwei Cumarinen zugeordnet werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die R_f -Werte und verschiedene Farbreaktionen der Herniariainhaltsstoffe aufgeführt.

T a b e l l e 1

Übersicht über die in Herba Herniariae papierchromatographisch nachweisbaren Inhaltsstoffe

Lösungsmittelsystem: Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)

Vermutl. Inhaltsstoffe	R_f -Wert	Sprühreagenz	Farbe im UV bzw. Reaktion
Flavonglykosid I	0,38	bas. Bleiazetat	stark grünlichgelb
Flavonglykosid II	0,36	bas. Bleiazetat	stark rotbraun
Flavonglykosid III	0,32	bas. Bleiazetat	schwach rotbraun
Flavonglykosid IV	0,28	bas. Bleiazetat	schwach rotbraun
Saponin	0,35	Blutlösung	Hämolyse
Cumarin I	0,94	Äthanol.KOH	Blaufloresz.
Cumarin II	0,92	Äthanol.KOH	starke Blaufloreszenz

Das Verhalten der Flavone vor der UV-Lampe in besprühtem und unbesprühtem Zustand zeigte, daß es sich entweder um Flavonole handelt, deren C_3 -Hydroxyl durch Zuckerbindung besetzt ist, die also C_3 -Glykoside darstellen, oder daß Flavone vorliegen, die am C_3 keine Hydroxylgruppe aufweisen⁸⁾.

8) R. COBET, Dissertation, München 1957, S. 8.

Eine nähere Charakterisierung der Cumarine und Saponine war auf Grund einfacher Farbreaktionen zunächst noch nicht möglich.

2) Isolierung der Flavonglykoside

a) Gewinnung eines chlorophyllfreien Auszuges

Wir führten zunächst eine methanolische Extraktion der Droge im Soxhlet durch und versuchten nach der "klassischen Methode" eine Abscheidung des Chlorophylls aus dem in Wasser gelösten Rückstand der methanolischen Lösung. Nachdem dies nicht gelang, wandten wir ein von der Lebensmittelchemie her bekanntes Verfahren an⁹⁾, bei dem die aus der wässerigen Extraktlösung durch Schütteln mit Chloroform gebildete Emulsion auf dem Wasserbad durch Abdampfen des Chloroforms zerstört wird. Auch hier kam es zu keiner ausreichenden Abscheidung von Chlorophyll, wofür wir die starke Oberflächenaktivität der Saponine verantwortlich machen. Am besten bewährte sich eine Vorextraktion der Droge mit Chloroform im Soxhlet, wodurch ein Großteil des Chlorophylls entfernt wurde. Die so vorextrahierte Droge konnte dann mit Methanol erschöpfend ausgezogen werden. Methanol wurde abdestilliert und der Rückstand in Wasser gelöst. Die Entfernung des noch enthaltenen Chlorophylls aus der wässerigen Lösung erfolgte durch Ausschütteln mit Chloroform, dem wegen der starken Emulsionsbildung 5% Äthanol zugesetzt wurde. Bei der papierchromatographischen Untersuchung dieses wässerigen, chlorophyllfreien Extraktes waren die einzelnen Flavonzonen auf dem Chromatogramm miteinander überlagert und daher nur undeutlich sichtbar. Wir suchten daher nach anderen Reinigungsmethoden des Extraktes und hielten auf Grund von Vorversuchen die Ausschüttelung mit Butanol für sehr geeignet. In Butanol waren nämlich alle vier Flavonglykoside leicht löslich, während die Saponine und stärker wasserlösliche Stoffe nur eine geringe Löslichkeit zeigten. Auf dem Chromatogramm wurde dies sichtbar durch das deutliche Auftreten genau begrenzter Flavonzonen ohne Schwanzbildung.

9) L. HÖRHAMMER, L. ENDRES, H. WAGNER u. F. RICHTHAMER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 342 (1957).

Wir schüttelten deshalb aus der wässerigen, chlorophyllfreien Extraktlösung die Flavonglykoside quantitativ mit Butanol aus, destillierten das Lösungsmittel im Vakuum ab und lösten den Rückstand in Wasser. Diese Lösung stellte den chlorophyllfreien und gereinigten Herniariaauszug dar.

b) Ausschüttelungsversuche

Mit dem gereinigten Herniariaauszug wurden Ausschüttelungsversuche mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Hierbei stellten wir fest, daß es kein selektives Lösungsmittel für eines der vier Flavonglykoside gibt. In Äthylazetat waren zwei Flavonglykoside, nämlich I und II etwas löslich, die beiden anderen (III und IV) dagegen praktisch unlöslich.

Es wurden daher zahlreiche Äthylazetatausschüttelungen der wässerigen Extraktlösung durchgeführt und auf diese Weise eine Lösung der Flavonglykoside I und II gewonnen. Aus dieser destillierten wir das Lösungsmittel ab und nahmen den Rückstand in Wasser auf.

c) Gewinnung eines Mischkristallisats der Flavonglykoside I und II

Nachdem es nicht möglich war, aus der unter b) erhaltenen Lösung der Flavonglykoside I und II in üblicher Weise ein Mischkristallisat zu erhalten, untersuchten wir verschiedene säulenchromatographische Methoden auf ihre Eignung. Sehr zweckmäßig erwies sich auf Grund von Vorversuchen das erstmals von J. IZQUIERDO-SORLI¹⁰⁾ zur Abtrennung von Gerbstoffen verwendete Polyamid Perlon.

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß zwischen Amidverbindungen und phenolischen Hydroxylgruppen starke Nebenvalenzkräfte bestehen. So hat K. FREUDENBERG¹¹⁾ bereits 1921 auf eine Anlagerungsverbindung zwischen Phenol und Harnstoff im Verhältnis

10) J. IZQUIERDO-SORLI, Dissertation, München (in Vorbereitung).

11) K. FREUDENBERG, Collegium (Darmstadt) 616, 353 (1921).

von 2 : 1 hingewiesen. W. GRASSMANN, H. HÖRMANN und A. HARTL¹²⁾ verwenden erstmals die Affinität von Phenolen zu Polyamiden zur Entwicklung eines chromatographischen Trennverfahrens für phenolische Substanzen an einer Perlonsäule.

L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und W. LEEB¹³⁾ übertragen diese Gedankengänge auf die Chromatographie von Flavonen an Polyamiden. Die Nebervalenzkräfte des Polyamids bewirken eine Bindung der Flavone und zwar ist diese umso stärker, je mehr Hydroxylgruppen in dem Flavon enthalten sind. "Ausnahmen beobachtet man nur bei o-Hydroxygruppierungen und Glykosiden in Fällen, in denen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mehr oder weniger stark sterisch behindert ist".

Als Säulen verwendeten wir Glasröhren mit einem Durchmesser von 3,5-4 cm und einer Länge von 40-50 cm. In eine solche Glasröhre trugen wir das mit Wasser angeschlämmt Perlonpulver ein und gaben auf diese Säule die bei c) erhaltene wässrige Lösung der Flavonglykoside I und II. Die Flavonglykoside, die sich beim Eluieren mit ca. 800 ml destilliertem Wasser auf der Säule langsam nach unten bewegten, waren unter dem UV-Licht als dunkle Zone zu erkennen. Nachdem die Zone etwa die Säulenmitte erreicht hatte, eluierten wir mit 700 ml Methanol, fingen 500 ml glykosidhaltiges Eluat auf und kristallisierten aus einem Äthanol-Wassergemisch.

d) Trennung des Mischkristallisats der Flavonglykoside I und II

Die Trennung des Mischkristallisats erfolgte durch Adsorption und Verteilung auf einer Zellulose-Kieselgursäule¹⁴⁾, die vor reinem Kieselgur den Vorteil einer größeren Laufgeschwindigkeit der mobilen Phase aufwies. Als mobile oder Laufphase fand die Oberphase eines Gemisches aus Äthylazetat, Ameisensäure, Wasser (100+3+25) Verwendung. Sie erwies sich von mehreren Systemen als das geeignetste. Wir nehmen an, daß der günstige Trenneffekt dieses Gemisches weitgehend auf den Säurezusatz zurückzuführen ist,

12) W. GRASSMANN, H. HÖRMANN u. A. HARTL, Makromolekulare Chem. 21, 37 (1956).

13) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. W. LEEB, Naturwissenschaften 44, 513 (1957).

14) K. PALCH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, Bd. I, S. 113.

da wassergesättigtes Äthylazetat ebensowenig einen Trenneffekt ergab wie Äthylazetat mit steigenden Methanol- und Äthanolzusätzen (2-8 Volumprozent). Der Säurezusatz bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes nach der undissoziierten Form und damit eine erhöhte Löslichkeit in Äthylazetat.

Praktisch verfahren wir so, daß auf das in die Säule eingeschlammte, ca. 35 cm hohe Zellulose-Kieselgurgemisch das Mischkristallinat aufgetragen und mit dem Lösungsmittel entwickelt wurde. Unter der UV-Lampe konnte nach einiger Zeit eine Auftrennung der zunächst einheitlichen dunklen Zone in zwei Zonen beobachtet werden. Wir fingen 19 Fraktionen auf. Die ersten 9 Fraktionen enthielten bei der papierchromatographischen Überprüfung nur Flavonglykosid I, die nächsten 3 Fraktionen waren Mischfraktionen und die restlichen 7 stellten Fraktionen von Flavonglykosid II (mit Spuren von Flavonglykosid I) dar. Flavonglykosid I wurde durch zweimalige Kristallisation aus wässriger Lösung in reiner Form erhalten. Flavonglykosid II hingegen durch zweimalige Umkristallisation aus Methanol-Wasser.

e) Isolierung der Leberflavonglykoside III und IV

Bei der Papierchromatographie von Gesamtauszügen hatten wir festgestellt, daß die beiden anderen Flavonglykoside III und IV nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Da wir bei der Papierchromatographie eines Drogenextraktes aus 0,4 g Material nach dem Besprühen mit basischem Ethylazetat nur eine schwache Reaktion erhielten, mußten wir für die Gewinnung der Flavonglykoside III und IV von einer ziemlich großen Drogenmenge ausgehen.

Es wurde daher mit 5 kg Herba Herniariae eine methanolische und anschließend wässrige Extraktion im Siccotopf durchgeführt, da die verwendeten Soxhletapparaturen nur eine Füllmenge bis ca. 300 g zulassen. Die Abtrennung des Chlorophylls erfolgte durch Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Chloroform + 5%igem Äthanol.

Wir hatten bereits darauf hingewiesen, daß die Flavonglykoside I und II aus der wässrigen Lösung mit Äthylazetat ausgeschüt-

telt werden konnten. Diese Ausschüttelungen waren jedoch nie so quantitativ durchführbar, daß die Flavonglykoside III und IV allein in der wässerigen Lösung zurückblieben. Dies dürfte wohl auf eine relativ gute Wasserlöslichkeit der Flavonglykoside I und II zurückzuführen sein.

Es wurde daher wiederum nach säulenchromatographischen Verfahren gesucht, die eine Trennung der Flavonglykoside I und II von den Nebenflavonglykosiden ermöglichten.

Nachdem sich an unserem Institut die Verwendung von Perlon neben der Reinigung auch zur Trennung von Flavonen schon mehrfach bewährt hatte¹⁵⁾, wandten wir auch hier diese Methode an. Es gelang dabei, einen Großteil der Flavonglykoside I und II abzutrennen und zugleich die Flavonglykoside III und IV von stärker wasserlöslichen Stoffen zu reinigen.

Wir trugen dabei die gereinigte wässerige Extraktlösung auf eine Perlonsäule von 35 cm Höhe auf und eluierten mit Wasser. Der flavonglykosidfreie Vorlauf wurde verworfen. Die anschließenden 7 Fraktionen enthielten die Flavonglykoside III und IV, vermischt mit geringen Mengen Flavonglykosid I und II. Da wir die letzteren auch jetzt noch nicht durch Äthylazetatausschüttelung der wässerigen Lösung entfernen konnten, hielten wir auf Grund von Vorversuchen die Verwendung einer Magnesolsäule zur Abtrennung geeignet.

Magnesol ist ein Magnesiumtrisilikat der Firma Food and Chemical Corp., New York. C. H. ICE und S. H. WENDER¹⁶⁾ wiesen auf die Brauchbarkeit dieser Substanz zur Reinigung und Trennung von Flavonen hin. Sie tragen dabei die Substanz in wasserfreiem Azeton auf eine mit Azeton angeschlammte Magnesolsäule und eluieren mit Azeton, Äthylazetat und anderen organischen Lösungsmitteln.

Arbeitet man in wasserfreiem Milieu, so kommt es nur zu einer Adsorption des Flavons an das Magnesiumtrisilikat, in

15) L. HÖRHAJMER, H. WAGNER u. W. LEEB, Naturwissenschaften 44, 513 (1957).

16) C. H. ICE u. S. H. WENDER, J. Amer. chem. Soc. 75, 50 (1953).

wässrigem Medium dagegen spielt neben der Adsorption auch noch eine Komplexbildung mit den Magnesiumionen eine Rolle (Chelatbildung). Dieser Magnesiumkomplex zeichnet sich durch sehr gute Wasserlöslichkeit und dementsprechend geringere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aus. Als Folge beobachtet man, daß ein von Magnesol adsorbiertes Flavon beim Eluieren mit wasserhaltigen organischen Lösungsmitteln (z.B. 70% Äthanol) nur sehr unvollständig gewonnen werden kann, weil beim Eluieren zugleich Chelatbildung eintritt. Dies ist unseres Erachtens die Ursache für die bei Verwendung von Magnesolsäulen auftretenden Substanzverluste. Sie können jedoch vermieden werden, wenn man den Komplex mit Wasser aus der Säule eluiert und das Chelat durch Ansäuern mit Zitronensäure zerstört. Ausnahmen hiervon bilden Flavone mit freiem Hydroxyl in C_3 -Stellung, deren Chelat auch in zitronensaurer Lösung beständig ist, so daß eine Wiedergewinnung des freien Flavons möglicherweise erst in stark salzsaurer Lösung durchgeführt werden kann.

Praktisch verfahren wir so, daß auf das in eine Säule eingeschlämte Magnesol von ca. 18 cm Höhe die von der Perlonsäule erhaltene, eingedampfte und in Äthanol-Azeton gelöste Fraktion der angereicherten Nebenglykoside aufgetragen wurde. Auf Grund von Lösungsmittelversuchen wählten wir als Eluierungsmittel die Oberphase einer Mischung aus Äthylazetat-Methylalkohol-Wasser (90+10+30), in der die Flavonglykoside I und II gut löslich waren und die Nebenglykoside III und IV nur eine mäßige Löslichkeit zeigten. Beim Eluieren mit diesem Gemisch wanderten die beiden Hauptglykoside in einem schmalen Band durch die Säule, während sich die Nebenglykoside nur 1-2 cm vom Startpunkt entfernten. Ihre Eluierung gelang mit 300 ml Methanol. Nachdem sich nach vierwöchigem Stehen immer noch kein Kristallisat gebildet hatte, versuchten wir eine Trennung der Flavonglykoside III und IV aus der wässrigen Lösung. Dazu wurde die Lösung auf eine Perlonsäule von 35 cm Höhe aufgetragen und mit ca. 800 ml destilliertem Wasser eluiert. Aus 18 aufgefangenen Fraktionen erhielten wir neben 2 Mischfraktionen reine Lösungen der Flavonglykoside III und IV.

Eine Kristallisation der beiden Flavonglykoside gelang jedoch nicht. Wir führen dies auf die geringe Konzentration der Flavonglykoside und auf die Anwesenheit der stark oberflächenaktiven Saponine zurück.

3) Identifizierung der Flavonglykoside

Die Identifizierung der kristallin erhaltenen Flavonglykoside I und II erfolgte durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Papierchromatographie, UV-Spektrum, IR-Spektrum und quantitative Säurehydrolyse.

Die Aglykone wurden papierchromatographisch in mindestens zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen untersucht und mit authentischen Substanzen verglichen. Außerdem wurden ihre Azetyl-derivate dargestellt.

Um den Ort der Glykosidbindung festzustellen, wurden die Glykoside methyliert, die vollmethylierten Produkte hydrolysiert und die Schmelzpunkte der erhaltenen Derivate mit authentischen Methyläthern verglichen.

Zur Identifizierung der Zucker untersuchten wir die Hydrolysenfiltrate nach der Neutralisation papierchromatographisch und stellten ihnen authentische Zucker gegenüber.

Das in Lösung erhaltene Flavonglykosid III wurde partiell hydrolysiert und das Spaltprodukt papierchromatographisch mit ebenfalls partiell hydrolysiertem Flavonglykosid I verglichen.

Die quantitative Hydrolyse der nicht kristallin erhaltenen Flavonglykoside III und IV erfolgte nach der Anthronmethode.

a) Flavonglykosid I

Flavonglykosid I erhielten wir aus einem Mischkristallisat mit Flavonglykosid II nach Trennung über eine Zellulose-Kieselgursäule durch zweimalige Kristallisation aus Wasser. Das Glykosid war von kräftig gelber Farbe und zeigte unter dem Mikroskop feine Nadeln. Der Schmelzpunkt betrug 176°C .

Identifizierung des Aglykons

Bei der salzsauren Hydrolyse am Rückflußkühler erhielten wir als Aglykon eine Substanz, die sich in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen (Butanolgemisch R_f 0,72, Isopropanolgemisch R_f 0,28) auch im Durchlaufchromatogramm nicht von authentischem Isorhamnetin trennte.

Der Schmelzpunkt unseres Aglykons betrug 315° C, der Mischschmelzpunkt mit Isorhamnetin zeigte keine Depression.

Zur weiteren Identifizierung azetylierten wir die Substanz mit Essigsäureanhydrid + Natriumazetat und verglichen das Azetat mit azetyliertem Isorhamnetin.

Die Verbindung schmolz bei 205° C, der Mischschmelzpunkt mit authentischem Isorhamnetinazetat ($204-206^{\circ}$ C) zeigte keine Depression.

Die weitere Charakterisierung des Flavonglykosids erfolgte durch eine quantitative Hydrolyse. Der Aglykonanteil betrug 54,3% und zeigt damit gute Übereinstimmung mit der für ein Isorhamnetindiglykosid berechneten Aglykonmenge (56%).

Identifizierung des Zuckers

Zur Identifizierung der Zucker führten wir eine salzsaure Hydrolyse des Glykosids am Rückflußkühler durch. Das Filtrat wurde über einen Säureaustauscher (Dowex) neutralisiert und anschließend chromatographiert.

Im System Pyridin-Essigester-Wasser erhielten wir nach Besprühen mit Anilin-Phthalsäurereagenz einen braunen Fleck mit dem R_f -Wert 0,46 und einen rotbraunen mit dem R_f 0,63 (die Farbe war besonders deutlich unter der UV-Lampe zu beobachten). Die beiden Flecke zeigten Übereinstimmung der R_f -Werte und der Farbe mit authentischer Rhamnose bzw. Glucose.

Außerdem trugen wir die authentischen Substanzen zugleich mit den von uns gefundenen Zuckern auf den gleichen Startpunkt auf. Auch hier traten auf dem Chromatogramm nur zwei einheitliche Flecken auf, die der Glucose bzw. Rhamnose entsprechen.

Zuckerstellung

Durch den Zirkon-Zitronensäure-Test¹⁷⁾ wiesen wir zwar eine C₃-Verglykosidierung nach, konnten damit aber nicht entscheiden, ob beide Zucker in Form eines Rutinosids vorliegen, oder ob nur ein Zucker am C₃-Hydroxyl gebunden ist.

Es wurde daher das Flavonglykosid mit Dimethylsulfat in wasserfreiem Azeton methyliert und das erhaltene Methylprodukt zur Abspaltung der methylierten Zucker hydrolysiert.

Da uns für die Darstellung des entsprechenden Methyläthers zu diesem Zeitpunkt noch kein authentisches Isorhamnetinglykosid zur Verfügung stand, gingen wir von Rutin "Merck", einem Quercetin-3-rhamnoglucosid aus (Quercetin unterscheidet sich von Isorhamnetin nur durch eine fehlende Methylgruppe am C₃,) und stellten durch Methylierung und anschließende Hydrolyse ein 5,7,3',4'-Methoxy-3-hydroxyflavon her.

Beide Methylprodukte zeigten den gleichen Schmelzpunkt (189° C), auch der Mischschmelzpunkt brachte keine Depression. Damit ist die Glykosidbindung beider Zucker am C₃ als Rhamno-glucosid erwiesen.

CH-Bestimmung

Im folgenden sind die für ein Isorhamnetinrhamnoglucosid berechneten CH-Werte den experimentell gefundenen gegenübergestellt. Die Bestimmung wurde im Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, ausgeführt.

	C %	H %
berechnet:	53,30	5,4
gefunden:	52,51	5,68

Die erhaltenen Werte zeigen gute Übereinstimmung.

Spektren

Die UV-Spektren des Glykosids und seines Aglykons weisen je zwei Maxima auf (s. Abb. I, S. 15). Diese liegen beim Glykosid

17) L. HÖRHAMMER, u. R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951).

bei einer Wellenlänge von 255 m μ und 358 m μ , beim Aglykon bei 256 m μ und 370 m μ . Für das Maximum I errechnet sich bei quantitativer Einwaage für das Glykosid ein $\log \epsilon$ von 3,1986.

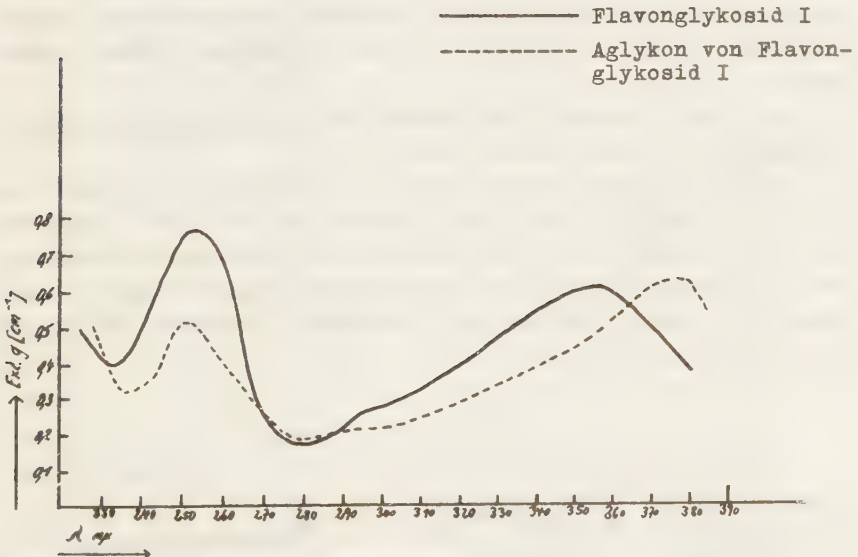
Die Spektren zeigen Ähnlichkeit mit denen von Rutin und Quercetin und weisen im Mittel das für Quercetinabkömmlinge charakteristische Extinktionsverhältnis beider Maxima von ca. 1,2 auf.

Glykosid: Extinktion bei 255 m μ 0,375, bei 358 m μ 0,280
Verhältnis: 1,3

Aglykon: Extinktion bei 256 m μ 0,240, bei 370 m μ 0,260
Verhältnis: 1,1

Abb. I

UV-Spektrum von Flavonglykosid I und seinem Aglykon



Noch vor Abschluß der Identifizierung von Flavonglykosid I erhielten wir von Prof. Dr. T. Kubota, Osaka, Japan, eine Probe von authentischem Isorhamnetinrhamnogluco-sid (= Narcissin)^{18)*}. Von diesem fertigten wir ein IR-Spektrum an.

Beim Vergleich der IR-Spektren (s. Abb. II u. III, S. 17) des isolierten Glykosids mit dem von authentischem Isorhamnetinrhamnogluco-sid findet man gute Übereinstimmung vor allem in der Lage der C=O Bande ($6,02 \mu$) und der für eine Disubstitution im Seitenphenyl maßgeblichen Absorptionen im Bereich von $800 - 740 \text{ cm}^{-1}$.

Die geringe Abweichung des Kurvenverlaufes von Narcissin im Bereich von 740 cm^{-1} und die etwas unscharfen Konturen zwischen $1200 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ sind zum Teil auf die schlechte Ausmessung, zum anderen aber auf kleine Mengen von Verunreinigungen zurückzuführen, die aus der authentischen Substanz auch durch mehrfache Kristallisation nicht entfernt werden konnten. Über die Zuckerstellung läßt sich aus dem IR-Spektrum nichts aussagen.

Das Hauptglykosid I ist demnach ein Isorhamnetin-3-rhamnogluco-sid der Formel I (s. S. 18).

Isorhamnetin-3-rhamnogluco-sid wurde bisher nur zweimal isoliert. Als Erstem gelang 1956 T. KUBOTA und T. HASE¹⁸⁾ die Isolierung aus den gelben Blütenblättern von *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* M. Roem. Die zweite Isolierung erfolgte im gleichen Jahr durch M. KOTAKE und H. ARAKAWA¹⁹⁾ aus den Pollen von *Lilium auratum* Lindle.

18) T. KUBOTA u. T. HASE, J. Inst. Polytechnics 5, 49 (1956).

19) M. KOTAKE u. H. ARAKAWA, Naturwissenschaften 43, 327 (1956).

*) Isorhamnetinrhamnogluco-sid wird wegen seines Vorkommens in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* M. Roem auch als Narcissin bezeichnet.

Abb. II

IR-Spektrum

Isorhamnetin-
rhamnoglucosid
(aus Herniaria)

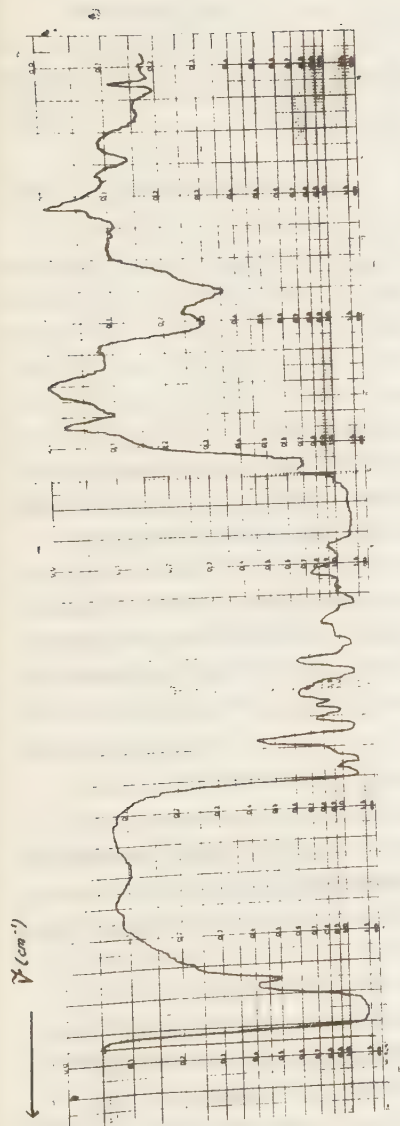
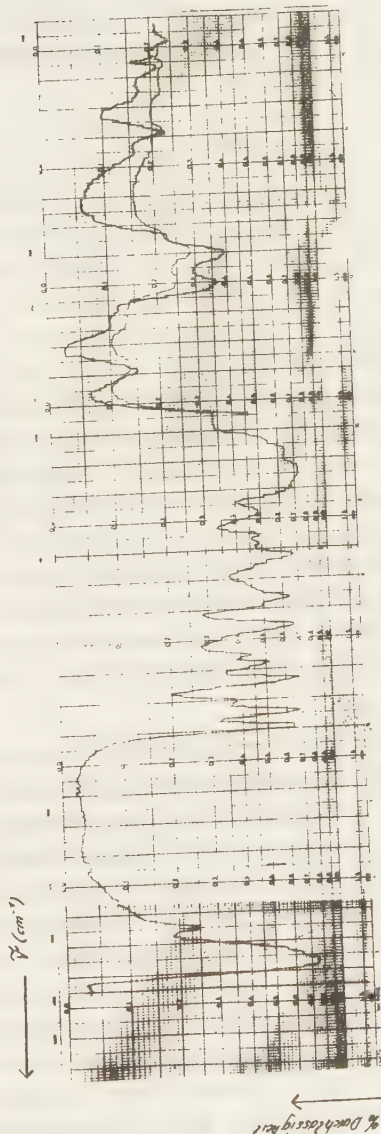


Abb. III

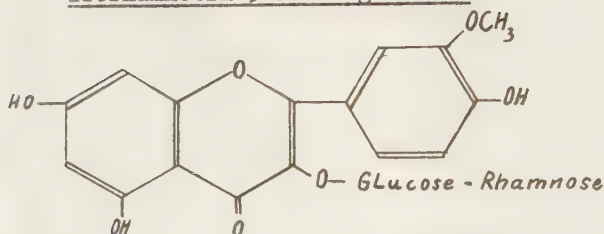
IR-Spektrum

Narcissin
authentisch



Formel I

Isorhamnetin-3-rhamnoglucosid



b) Flavonglykosid II

Aus dem Mischkristallisat der Flavonglykoside I und II wurde Glykosid II nach Trennung über eine Zellulose-Kieselgursäule durch zweimalige Umkristallisation aus Methanol-Wasser gereinigt. Es bildete grünlichgelbe Nadeln und schmolz bei 192-193° C.

Da unser Glykosid bei der Papierchromatographie den gleichen R_f -Wert wie Rutin aufwies und auch in der Bleifarbe übereinstimmte, führten wir mit reinem Rutin "Merck" eine Mischschmelzpunktsbestimmung durch. Diese erbrachte keine Depression.

Identifizierung des Aglykons

Bei der salzsauren Hydrolyse des Glykosids am Rückflußkühler wurde eine Substanz gewonnen, die sich in zwei verschiedenen Lösungsmitteln auch im Durchlaufchromatogramm nicht von authentischem Quercetin trennte. Der Schmelzpunkt des Aglykons betrug 298-300° C, der Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetin zeigte keine Depression.

Außerdem wurde eine Azetylierung unseres Aglykons mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat durchgeführt. Die nach dem Umkristallisieren erhaltenen weißen Kristalle schmolzen bei 189° C. Dieser Schmelzpunkt liegt innerhalb der für Quercetinpentaazetat in der Literatur angegebenen Werte (188-193° C).

Außerdem wurde eine quantitative Hydrolyse durchgeführt, um entscheiden zu können, ob ein Mono-, Di- oder Triglykosid vorliegt. Das Ergebnis von 51% Aglykonanteil spricht für ein Diglykosid.

Identifizierung der Zucker

Zur Identifizierung der Zucker führten wir nochmals eine salzsaure Hydrolyse des Glykosids durch. Das Filtrat wurde über einen Säureaustauscher (Dowex) neutralisiert und anschließend chromatographiert. Im System Pyridin-Essigester-Wasser erhielten wir nach Besprühen mit Anilinphthalsäurereagenz zwei Flecke, von denen der eine braune Farbe zeigte (R_f 0,46), während der zweite (R_f 0,63) eine mehr rotbraune Farbe aufwies. Beide Flecken zeigten in den R_f -Werten und der Farbe Übereinstimmung mit authentischer Rhamnose und Glucose.

Außerdem trugen wir die authentischen Substanzen zugleich mit den von uns gefundenen Zuckern auf den gleichen Startpunkt eines Chromatogrammes auf. Auch hier traten auf dem Chromatogramm nur zwei einheitliche, Glucose und Rhamnose zuzuordnende Flecke auf.

Zuckerstellung

Um die Zuckerstellung zu klären, wurde das Glykosid mit Dimethylsulfat in wasserfreiem Azeton methyliert und das erhaltene Methylprodukt zur Abspaltung der methylierten Zucker hydrolysiert. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Methanol-Wassergemischen erhielten wir weiße Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 190° C.

Durch Methylierung von Rutin und anschließender Hydrolyse stellten wir ein 5,7,3',4'-Methoxy-3-oxyflavon her. Der Mischschmelzpunkt beider Methylprodukte zeigte keine Depression.

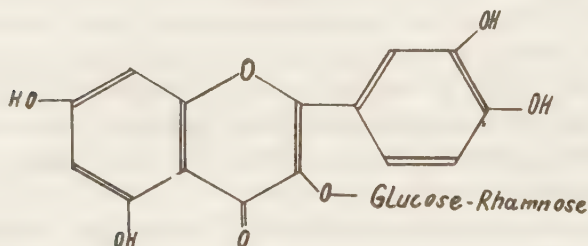
Spektrum

Das UV-Spektrum des Glykosids (Maxima bei 255 m μ und 358 m μ) und seines Aglykons (255 m μ und 369 m μ) stimmen mit denen von Rutin und Quercetin überein.

Das untersuchte Hauptflavonglykosid II ist demnach mit Rutin der Formel II identisch. Rutin ist ein im Pflanzenreich verbreitetes Flavonglykosid, das aber noch nie in *Herniaria* beschrieben wurde. Innerhalb der Familie der Caryophyllaceae ist es bisher nur bei *Dianthus caryophyllatus* L. als Inhaltsstoff bekannt geworden¹⁹⁾.

F o r m e l II

Rutin



c) Flavonglykosid III

Flavonglykosid III konnte aus dem wässerigen Extrakt mit Flavonglykosid IV über eine Perlonsäule angereichert, über eine Magnesolsäule von den Hauptglykosiden getrennt und mit Hilfe einer zweiten Perlonsäule durch fraktionsweises Auffangen des Eluats von Nebenflavonglykosid IV befreit werden. Von diesen Fraktionen enthielten nur wenige saponinfreies Flavonglykosid III.

Identifizierung der Aglykone

Mit einem Teil der saponinhaltigen Lösung führten wir eine salzsaure Hydrolyse am Rückflußkühler durch. Das in der Lösung enthaltene Saponin stört dabei nicht, denn es wird nur in stark saurer Lösung nach 3-4stündigem Erhitzen hydrolysiert. Wir führten dagegen die Hydrolyse nur in 5% salzsaurer Lösung über 45 Minuten durch. Das dabei erhaltene Aglykon war papierchromato-

19) H. REZNIK, Z. Bot. 43, 499 (1955).

graphisch einheitlich und trennte sich in zwei verschiedenen Lösungen auch im Durchlaufchromatogramm nicht von authentischem Isorhamnetin.

Wie eine Schmelzpunkts- und Mischschmelzpunktsbestimmung ergab, war jedoch das erhaltene Aglykon nicht ganz rein. Wir reinigten es daher über eine Magnesolsäule mit Azeton als Eluierungsmittel. Durch Umkristallisation aus Methanol-Wasser erhielten wir geringe Mengen einer grünlichgelben Substanz, die einen Schmelzpunkt von 314-315° C aufwies und bei der Mischschmelzpunktsbestimmung mit authentischem Isorhamnetin keine Depression zeigte.

Identifizierung der Zucker

Mit dem bei der Gewinnung des Aglykons erhaltenen Hydrolysenfiltrat führten wir die Zuckerbestimmung nach Neutralisation der Säure papierchromatographisch durch. Nach Besprühen des Chromatogramms mit Anilin-Phthalsäurereagens und Trocknen bei 110° C wurden zwei Flecke erhalten, die in bezug auf R_f -Wert und Farbe wiederum mit Rhamnose und Glucose als Testsubstanz übereinstimmten.

Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode

Die quantitative Zuckerbestimmung erfolgte nach der Anthronmethode²⁰⁾. Wir bestimmten zunächst den Aglykonanteil des Glykosids und erhielten in 2 ml saponinfreier Stammlösung nach salzsaurer Hydrolyse eine Aglykonkonzentration von 65,6 γ. Der Zuckeranteil in derselben Menge Stammlösung betrug 96 γ.

Dies entspricht einem Aglykon:Zucker-Verhältnis von 1 : 1,68.

Aus dem Molekulargewicht des Isorhamnetins (316), eines Mono- (478), Di- (640) und Triglykosids (802) läßt sich durch stöchiometrische Rechnung die Mengen der einzelnen Glykoside und ihrer Zucker erfassen. Für ein Triglykosid gilt dabei folgendes Verhältnis:

20) L. HÖRHAMMER, E. VORNDRAN u. H. WAGNER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsoh. pharmaz. Ges. 289/61, 316 (1956).

Mol.-Gew. Aglykon : Mol.-Gew. Triglykosid = gef. Aglykon : x
316 : 802 = 65,6 : x

x = 166,3 γ Triglykosid = 100,7 γ Zucker.

Die von uns gefundenen 96 γ Zucker stehen in gutem Einklang mit der theoretisch berechneten Menge von 100,7 γ. Dieses Ergebnis erklärt auch den niedrigen R_F -Wert des Glykosids bei der papierchromatographischen Untersuchung.

Partielle Hydrolyse

Zur weiteren Klärung des Flavonglykosids III führten wir eine partielle Hydrolyse nach D. W. FOX, W. L. SAVAGE und S. H. WENDER²¹⁾ durch. Dabei wurde die gut getrocknete eingedampfte Glykosidlösung mit Ameisensäure in Cyclohexanol 8 Stunden lang am Rückflußkühler in schwachem Sieden gehalten und dann chromatographiert. Auf dem Chromatogramm waren neben unverändertem Glykosid drei weitere Flavonflecke zu erkennen, die in bezug auf R_F -Wert (System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser) mit den durch partielle Hydrolyse aus Isorhamnetinrhamnoglucosid erhaltenen Produkten (unverändertes Glykosid: R_F 0,38; Isorhamnetin-3-glucosid: R_F 0,52; Isorhamnetin: R_F 0,71) übereinstimmten.

Zuckerstellung

Den Beweis für eine C_3 -Verglykosidierung von Flavonglykosid III erbrachte der Zirkontest²²⁾. Der mit Zirkonoxychloridlösung gebildete Chelatkomplex von intensiv gelber Farbe wurde dabei in zitronensaurer Lösung entfärbt. Bei einer freien Hydroxylgruppe am C_3 -Atom würde der Chelatkomplex auch in zitronensaurer Lösung beständig sein.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen nehmen wir an, daß es sich um ein Isorhamnetinr triglykosid handelt, welches sich von Isorhamnetin-3-rhamnoglucosid durch ein zusätzliches Molekül Rhamnose oder Glucose unterscheidet. Über die Stellung des drit-

21) D. W. FOX, W. L. SAVAGE u. S. H. WENDER, J. Amer. chem. Soc. 75, 2504 (1953).

22) L. HÖRHAMMER u. R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951).

ten Zuckermoleküls können wir nichts aussagen, da eine Darstellung des Methyläthers nicht möglich war und auch die Aufnahme des UV-Spektrums infolge geringer Verunreinigungen des Glykosids keine eindeutige Aussage ermöglichte. Nachdem in der letzten Zeit ein Isorhamnetin-3-glucorhamnogalactosid isoliert worden war²³⁾, bei dem alle Zucker am C₃-OH verglykosidiert sind, ist es durchaus möglich, daß unser Flavonglykosid auch in diese Klasse einzureihen ist.

d) Flavonglykosid IV

Flavonglykosid IV konnte nach Abtrennung der Hauptflavonglykoside I und II über eine Perlonsäule von Flavonglykosid III befreit werden. Auch hier war der größere Teil der flavonglykosid-IV-haltigen Lösung mit Saponin verunreinigt.

Identifizierung des Aglykons

Bei der salzsauren Hydrolyse am Rückflußkühler erhielten wir eine Substanz, die bei der papierchromatographischen Untersuchung im System Isopropanol-Eisessig-Wasser den gleichen R_F-Wert wie Quercetin zeigte und sich von diesem auch im Durchlaufchromatogramm nicht trennte. Unter der UV-Lampe betrachtet, zeigten beide Substanzen die gleiche leuchtend gelbe Färbung, die sich beim Besprühen mit basischem Bleiazetat nach rotbraun veränderte.

Die weitere Reinigung des Aglykons erfolgte wiederum über eine Magnesolsäule, wie bereits für Isorhamnetin auf Seite 21 beschrieben wurde. Die durch Umkristallisation erhaltenen Kristalle schmolzen bei 298-300° C und erbrachten bei der Mischschmelzpunktsbestimmung mit Quercetin keine Depression.

Identifizierung der Zucker

Mit dem Filtrat der salzsauren Hydrolyse führten wir die Zuckerbestimmung papierchromatographisch in üblicher Weise durch. Es wurde dabei ein Fleck erhalten, der in seinem R_F-Wert und seiner Farbe mit Glucose als Testsubstanz übereinstimmte.

23) G. TAPPI u. E. MENZIANI, Gazz. chim. ital. 85, 694 (1955).

Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode

Bei der quantitativen Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode erhielten wir in 2 ml Stammlösung 69 γ Zucker. Die Aglykonmenge in 2 ml Stammlösung betrug 46 γ . Damit ergibt sich ein Aglykon:Zucker-Verhältnis von 1 : 1,66.

Stöchiometrie:

$$\begin{array}{rclclcl} \text{Mol. Aglykon} & : & \text{Mol. Glykosid} & = & \text{gef. Aglykon} & : & x \\ 302 & : & 788 & = & 46 & : & x \end{array}$$

Die gefundene Zuckermenge von 69 γ (theoretisch 74 γ) spricht für das Vorliegen eines Triglykosids.

Zuckerstellung

Den Nachweis einer C₃-Glykosidbindung führten wir mit dem Zirkon-Zitronensäuretest²⁴⁾, bei dem in zitronensäurer Lösung der mit Zirkonoxychlorid gebildete Chelatkomplex entfärbt wurde.

Nebenflavonglykosid IV ist damit als ein Quercetinglucosid, vermutlich ein Quercetin triglucosid charakterisiert.

4) Übersicht über die in verschiedenen Herniariaarten vorkommenden Haupt- und Nebenflavonglykoside und ihre Verteilung in den einzelnen Pflanzenteilen

Zur Ergänzung unserer Ergebnisse chromatographierten wir auch andere Herniariaarten (vier von insgesamt fünf bekannten) (s. Tab. 2, S. 25). Wir stellten dabei fest, daß die Hauptflavonglykoside I und II in allen Arten enthalten sind und etwa gleiche Konzentration aufweisen. Die Nebenflavonglykoside III und IV ließen sich dagegen bei *Herniaria alpina* Vill. nicht nachweisen.

24) L. HÖRHAMMER u. R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951).

T a b e l l e 2

	Blüten				Blätter			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
<i>Herniaria glabra</i> L.	++++	+++	+	+	+++	+++	+	+
<i>Herniaria hirsuta</i> L.	++++	+++	+	+	+++	+++	+	+
<i>Herniaria latifol.</i> L.	++++	+++	+	+	+++	+++	+	+
<i>Herniaria alpina</i> Vill.	++++	+++	-	-	++++	+++	-	-

	Stengel				Wurzeln			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
<i>Herniaria glabra</i> L.	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Herniaria hirsuta</i> L.	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Herniaria latifol.</i> L.	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Herniaria alpina</i> Vill.	+++	+++	-	-	-	-	-	-

I = Isorhamnetin-3-rhamnoglucosid II = Quercetin-3-rhamnoglucosid
 III = Isorhamnetin triglykosid IV = Quercetin-triglykosid

Konzentration: ++++ stark konzentriert
 +++ mittlere Konzentration
 ++ schwache Konzentration
 + sehr schwache Konzentration
 - Flavonglykosid fehlt

Über die Cumarine von Herba Herniariae

1) Einleitung

Nachdem bei der papierchromatographischen Untersuchung von Gesamtauszügen neben Flavonglykosiden noch andere Inhaltsstoffe festgestellt werden konnten, wandten wir uns nunmehr den Cumarinen zu, zunächst einmal um die Existenz des von M. GOBLEY²⁵⁾ aufgefundenen 7-Methoxycumarins nachzuprüfen, zum anderen um Näheres über das zweite Cumarin zu erfahren.

Unter Cumarinen versteht man Abkömmlinge eines 5,6-Benz- α -pyrons, von dem sich die einfachen Vertreter dadurch ableiten, daß der Benzolkern durch Oxy- und Alkoxygruppen substituiert wird (z.B. Aesculetin = 6,7-Dioxycumarin). Bei den höhermolekularen Cumarinen kann der Benzolkern mit einem Furanring (z.B. Angelicin) oder der Lactonring mit einem zweiten Benzolkern kondensiert sein (z.B. das 2',3'-Dihydroxydibenz- α -pyron aus Castoreum). Das in Herniaria beschriebene Herniarin zählt daher als 7-Methoxycumarin zu den einfacheren Vertretern dieser Gruppe.

Cumarine kommen in zahlreichen Pflanzen vor, teils in freier Form, zum Teil in glykosidischer Bindung²⁶⁾. Durch Säurehydrolyse können diese Glykoside leicht gespalten werden.

Wegen ihrer diuretischen, bakteriziden und anticoagulativen Wirkung²⁷⁾ sind verschiedene Cumarine auch von besonderem therapeutischen Interesse.

2) Isolierung

a) Vorversuche:

Bei der Papierchromatographie von Gesamtauszügen im System Athylazetat-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) hatten wir an der Lösungsmittelfront eine stark blaufluoreszierende Zone festgestellt (s. S. 5). Diese war in ihrer Fluoreszenz nicht einheitlich, denn der obere Teil fluoreszierte grünblau, der untere

25) M. GOBLEY, J. Pharmac. Chim. 20, 270 (1874).

26) F. M. DEAN in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Wien 1952, Bd. IX, S. 239.

27) F. M. DEAN in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Wien 1952, Bd. IX, S. 240-242.

rein blau. Wir hatten daraus geschlossen, daß es sich nicht um einen, sondern möglicherweise um zwei Stoffe handeln konnte. Nachdem in beiden Fällen die Sprühreaktion mit äthanolischer Kalilauge, einem von A. BAERHEIM-SVENDSEN²⁸⁾ zum Nachweis verschiedener Cumarine angegebenen Reagenz, eine intensive Zunahme der Fluoreszenz im UV-Licht erbrachte (s. Tab. 1, S. 5) war es nicht ausgeschlossen, daß es sich bei den zu untersuchenden Stoffen um zwei Cumarine handelte, wie schon auf Grund der einleitenden Vorversuche vermutet wurde.

Nachdem in der Droge nur ein Cumarin beschrieben ist, konnte die Isolierung des zweiten neue Gesichtspunkte bringen. Wir suchten daher in der Literatur nach verschiedenen für Cumarine geeigneten Extraktionsverfahren²⁹⁾ und fanden, daß die freien Cumarine infolge ihres hydrophoben Charakters am besten mit Benzin, Äther oder Chloroform extrahiert werden, die hydrophilen Cumaringlykoside dagegen mit Wasser oder Wasser-Äthanolgemischen.

Da wegen des hohen R_F -Wertes eine glykosidische Bindung der in Herniaria enthaltenen Cumarine ausgeschlossen werden konnte, extrahierten wir die Droge zunächst mit Chloroform und chromatographierten die erhaltene Lösung. An der Lösungsmittelfront stellten wir eine einheitliche, eng begrenzte, grünblau fluoreszierende Zone fest, während die darunterliegende blaue im Chloroformauszug fehlte.

Es schien demnach so, daß nur eine der beiden Substanzen in Chloroform löslich ist und zwar die mit dem höchsten R_F -Wert, so daß wir diese durch Behandeln mit Chloroform selektiv von der zweiten abtrennen konnten. Nachdem uns bekannt war, daß das in der Droge beschriebene Herniarin ebenfalls chloroformlöslich ist, ließen wir authentisches Herniarin "Merck" im Papierchromatogramm mitlaufen und stellten in zwei verschiedenen Lösungsmitteln keinen R_F -Unterschied und im UV-Licht die gleiche grünblaue Fluoreszenz fest.

Einer der beiden Stoffe, und zwar der blaufluoreszierende mit dem höchsten R_F -Wert ist demnach mit Herniarin identisch.

28) A. BAERHEIM-SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Oslo 1954, S. 37.

29) F. M. DEAN in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Wien 1952, Bd. IX, S. 239.

Für den zweiten, auf dem Papierchromatogramm darunterliegenden, hatten wir bereits festgestellt, daß er chloroformunlöslich ist und sich wegen des etwas niedrigeren R_f -Wertes hydrophiler als Herniarin verhalten mußte. Wir versuchten ihn deshalb mit Äther aus der Droge zu extrahieren, mußten aber papierchromatographisch feststellen, daß er mit diesem Lösungsmittel nur sehr ungenügend extrahiert wird. Sehr geeignet erwies sich dagegen reines Methanol, das auch für die folgende Extraktbereitung verwendet wurde.

b) Extraktbereitung

Zur Entfernung eines Großteils Herniarin extrahierten wir je zweimal 300 g Droge im Soxhlet mit Chloroform bis zur Farblosigkeit. Die Droge wurde dann mit Methanol erschöpfend ausgezogen und der Rückstand in Wasser gelöst. Aus der wässerigen Lösung schüttelten wir Chlorophyll und einen weiteren Anteil Herniarin mit Chloroform aus.

Für die Isolierung der gesuchten Substanz aus der wässerigen Extraktlösung sahen wir auf Grund säulenchromatographischer Untersuchungen eine Perlonsäule als sehr geeignet an. Wir brachten deshalb den wässerigen Extrakt auf eine Perlonsäule von ca. 35 cm Höhe und eluierten mit ca. 1,5 l destilliertem Wasser. Wir beobachteten dabei, daß sich das blaufluoreszierende Cumarin kaum vom Startpunkt wegbewegte, während ein Großteil stärker wasserlöslicher Substanzen eluierbar war. Die Eluierung des Cumarins gelang dagegen mit reinem Äthanol, von dem eine 100 ml enthaltende Fraktion aufgefangen wurde.

Wir chromatographierten die äthanolische Lösung und stellten neben einem blaufluoreszierendem Fleck an der Lösungsmittelfront noch dunkelbraune Zonen fest, die Flavonglykosiden zugeordnet werden konnten. Zur Entfernung der letzteren trugen wir daher die auf 10 ml eingedampfte äthanolische Fraktion der Perlonsäule auf eine zweite Perlonsäule auf und eluierten mit 30%igem Methanol. Auf der Säule bewegten sich dabei die Flavonglykoside schneller als der blaufluoreszierende Stoff. Wir fingen sechs Fraktionen zu je 100 ml auf und chromatographierten

die erhaltenen Lösungen. Die ersten 300 ml enthielten Flavon-glykoside, die nächsten 200 ml waren Flavon- und Cumarin-frei und die letzte Fraktion enthielt papierchromatographisch reines Cumarin.

Durch zweimalige Kristallisation aus Methanol-Wasser wurden rötlichweiße Kristalle gewonnen. Aus 600 g Droge erhielten wir etwa 6,2 mg Substanz.

3) Identifizierung

Die aus der Extraktlösung durch mehrfache Reinigung über eine Perlonsäule erhaltene Substanz wurde durch zweimalige Umkristallisation aus Methanol-Wasser in weißen Nadeln gewonnen. Wegen des hohen Schmelzpunktes (223° C) konnte sie nicht mit Herniarin identisch sein, mußte jedoch infolge des fast gleichen R_f -Wertes und der intensiven Fluoreszenzzunahme durch Besprühen mit äthanolischer Kalilauge in seiner chemischen Konstitution mit Herniarin verwandt sein. Es wurden daher die in der Literatur bekannten Schmelzpunkte³⁰⁾ verschiedener einfacher Cumarinderivate mit dem unsrigen verglichen. Den höchsten Schmelzpunkt von allen weist Umbelliferon, ein 7-Oxycumarin (223° C), auf.

Wir führten deshalb eine Mischschmelzpunktsbestimmung unserer Substanz mit authentischem Umbelliferon durch und erhielten dabei keine Depression.

Bei der Chromatographie im System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (R_f 0,92) und Butanol-Eisessig-Wasser (R_f 0,88) zeigte die untersuchte Substanz bezüglich der R_f -Werte keinen Unterschied zu Umbelliferon als Testsubstanz.

Im UV-Licht beobachteten wir in beiden Fällen die gleiche Fluoreszenz, die sich beim Besprühen mit äthanolischer Kalilauge außerordentlich verstärkte.

Zur weiteren Klärung wurde eine CH-Bestimmung durchgeführt (Mikroanalytisches Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr). Aus der Gegenüberstellung der für Umbelliferon berechneten CH-Werte mit den experimentell gefundenen ergibt sich eine gute Übereinstimmung:

30) F. M. DEAN in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Wien 1952, Bd. IX, S. 242-257.

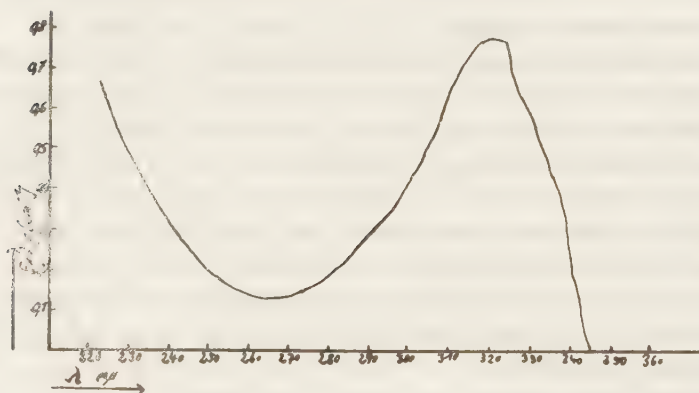
Umbelliferon

	C	H
berechnet	66,40%	3,72%
gefunden	66,20%	3,66%.

Das UV-Spektrum (s. Abb. IV) weist nur ein Maximum bei 320 m μ auf und stimmt darin mit dem von authentischem Umbelliferon überein. Bei quantitativer Einwaage von 0,015 g/l beträgt der $\log \epsilon$ des Maximums 3,82930.

Abb. IV

UV-Spektrum von Umbelliferon



Zum weiteren Identitätsnachweis fertigten wir IR-Spektren von der von uns isolierten Substanz und von authentischem Umbelliferon an (s. Abb. V u. VI, S. 31).

Beide Spektren zeigen die für Laktone charakteristische C=O Bande zwischen 1700-1750 cm^{-1} , die durch die Doppelbindung im Laktonring etwas längerwelliger gefunden wird³¹⁾. Im übrigen Absorptionsverlauf herrscht zwischen den beiden Spektren eine gute Übereinstimmung.

31) A. R. H. COLE in L. ZOBELISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Wien 1956, Bd. XIII, S. 36.

Abb. V

Umbelliferon
aus Herniaria

% Nachweisbarkeit

→ γ (cm⁻¹)

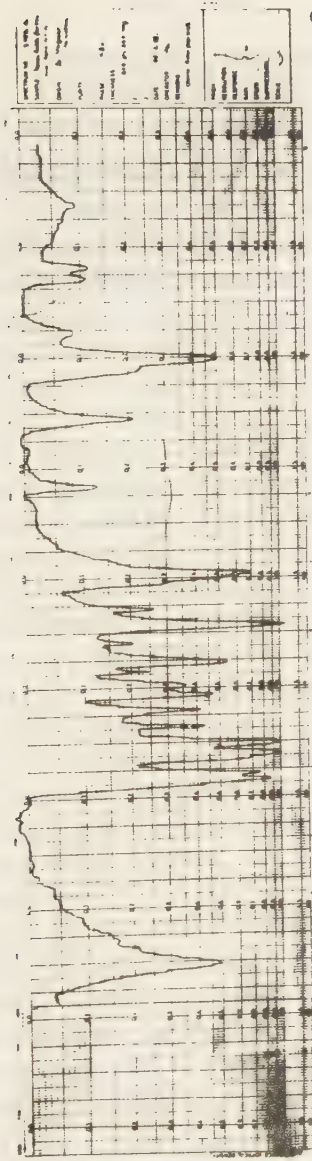
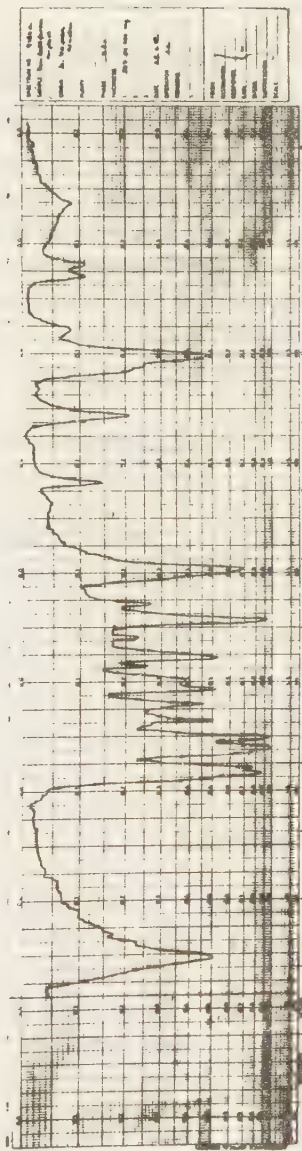


Abb. VI

Umbelliferon
authentisch

% Nachweisbarkeit

→ γ (cm⁻¹)

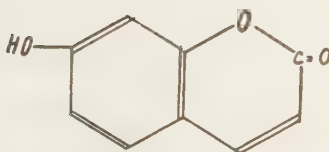


Alle ausgeführten Reaktionen sprechen dafür, daß unsere Substanz mit Umbelliferon der Formel III identisch ist, womit auf die Durchführung eines Alkaliabbaus verzichtet werden konnte.

Umbelliferon ist ein in der Natur verbreitetes Cumarin, das, wie der Name andeutet, vorwiegend in Umbelliferen, wie *Ferula galbanum*, aber auch in anderen Familien, so bei *Matricaria chamomilla* (Compositae) vorkommt. Seine Isolierung aus *Herniaria* wurde bisher noch nicht beschrieben.

F o r m e l III

Umbelliferon



Die Saponine von Herba Herniariae

1) Einleitung

Nachdem wir die in der Droge enthaltenen Flavonglykoside und Cumarine isoliert hatten und dabei des öfteren auf Saponine gestoßen waren, die durch ihre starke Oberflächenaktivität die Abscheidung des Chlorophylls verhindert und vor allem die Kristallisation der Flavonglykoside erschwert hatten, wendeten wir uns nun zur weiteren Klärung der Inhaltsstoffe diesen Substanzen zu.

Unter Saponinen versteht man in der üblichen Begriffsfassung hochmolekulare, stickstofffreie Glykoside³²⁾, die sich außer ihrer bereits erwähnten starken Oberflächenaktivität noch durch eine ausgeprägte hämolytische Wirksamkeit auszeichnen. Da diese Eigenschaften neuerdings nicht mehr für alle Saponine gelten, haben kürzlich R. TSCHESCHE und H. HEESCH³³⁾ darauf hingewiesen, daß eine genauere Einteilung nach chemischen Gesichtspunkten zu fordern ist. Danach unterscheidet man zwei große Saponingruppen³⁴⁾, die der Steroidsaponine und die der Triterpensäuren, wobei die letzteren je nach Ringkondensation in tri-, tetra- und pentacyclische Triterpene eingeteilt werden. Sowohl die Triterpensaponine wie auch die Steroidsaponine kommen teils frei als sogenannte Sapogenine, teils in glykosidischer Bindung mit Zuckern vor.

In Herniaria beschreibt F. DAEBLER³⁵⁾ zwei Saponine, nämlich ein neutrales (Häm.-Index 1 : 50000) und ein saures (Häm.-Index 1 : 5000), ohne die Konstitution dieser Stoffe aufklären zu können. Der Begriff des sauren Saponins entspricht nach K. PAECH und M. V. TRACEY³⁶⁾ nicht mehr den heutigen Kenntnissen über Saponine, denn er sagt nichts darüber aus, ob die Säure-

32) G. MADAUS, Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Leipzig 1938, Bd. I, S. 22.

33) R. TSCHESCHE u. A. HEESCH, Chem. Ber. 85, 1067 (1952).

34) K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S.58 u. 176.

35) F. DAEBLER in R. KOBERT, Neue Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen, 1916, Bd. I, S. 65.

36) K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 61.

eigenschaft im Sapogenin ihre Ursache hat, oder der saure Bestandteil in glykosidischer Bindung mit dem Sapogenin vorliegt (z.B. Glucuronsäure).

Zur Klärung der von F. Daebler gemachten Angaben versuchten wir das Saponin nach einer von F. Daebler abweichenden Methode zu isolieren und dann weiter aufzuklären.

2) Isolierung der Saponine

Die Droge wurde im Soxhlet erschöpfend mit Methanol extrahiert und mit der erhaltenen Extraktlösung Vorversuche zur Abscheidung der Saponine unternommen. Dabei zeigte es sich, daß sich die in der Literatur³⁷⁾ beschriebenen Fällungsreaktionen mit basischem oder neutralem Bleiazetat und die Ätherfällung der methanolischen Saponinlösung nicht bewährten.

Mittels der Bleiazetatfällung werden auch Flavone und Säuren mitgefällt. Wir hielten deshalb diese Methode wegen der im Extrakt mitenthaltenen Flavonglykoside nicht geeignet.

Äther fällt aus methanolischer Lösung nicht nur Saponine, sondern alle Stoffe, die sehr hydrophil sind; wir erhielten daher auch bräunlich schmierige Produkte, deren Reinigung große Schwierigkeit bereitete.

Wir suchten nun nach weiteren Fällungsmitteln, die in ihre hydrophilen Verhalten zwischen Äther und Methanol stehen. Am besten bewährte sich dabei reines Äthanol, mit dem wir durch Verwendung eines bestimmten Verhältnisses methanolischer Pflanzenextraktlösung zu Äthanol (2 : 1) Produkte erhielten, die zwar verunreinigt gelblich amorph, jedoch nicht bräunlich schmierig vorlagen. Die erhaltenen Präzipitate wurden erneut in Methanol gelöst und wiederum mit der halben Menge Äthanol gefällt. Durch Umkristallisation aus Methanol erhielten wir schließlich weiße Saponinprodukte. Mit diesen wurden papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt.

3) Papierchromatographie der Saponine

Nach N. L. DUTTA³⁸⁾ lassen sich Saponine im System Butanol

37) K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 77.

38) N. L. DUTTA, Nature (London) 175, 85 (1955).

Eisessig-Wasser (4+1+2) absteigend oder aufsteigend chromatographieren. Die Charakterisierung der Saponinzonen erfolgte auf den getrockneten Chromatogrammen durch Besprühen mit Blutlösung³⁹⁾, wobei sich die Saponine durch die dabei auftretende Hämolyse zu erkennen geben, oder mittels einer von N. L. DUTTA⁴⁰⁾ angegebenen alkalischen natriummetaperjodathaltigen Kaliumpermanganatlösung. Im letzteren Fall sind die Saponine als braune Flecke zu erkennen. Wir chromatographierten das von uns isolierte Herniariasaponin und besprühten mit den oben genannten Reagenzien. In beiden Fällen wurde je ein engumgrenzter Fleck mit dem R_f -Wert 0,52 erhalten (Butanol-Eisessig-Wasser, 4+1+2). Da auch im Durchlaufchromatogramm keine weitere Auftrennung der einen Saponinzone auftrat, war anzunehmen, daß nur eine Saponinkomponente vorliegt.

4) Nachweisreaktionen zur Charakterisierung des Saponins

Nachdem das Saponin isoliert und papierchromatographisch als einheitlich festgestellt worden war, versuchten wir einen ersten Einblick in die Struktur des Saponins zu gewinnen, indem wir untersuchten, ob das Saponin in die Gruppe der Triterpensäuren oder in die der Steroidsaponine gehört.

Farbreaktionen

Zunächst wurden zwei Farbreaktionen ausgeführt, deren positiver Ausfall das Vorhandensein eines Triterpensaponins nicht ausschloß:

- a) Einige mg Herniariasaponin wurden warm in 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst und dazu 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure gegeben. Über einen roten Farbstoff trat deutlich Grünfärbung der Lösung ein (Reaktion nach C. LIEBERMANN u. C. BURCHARD⁴¹⁾).
- b) Einige Milligramm Herniariasaponin erhitzen wir mit ebensoviel Trichloressigsäure im Reagenzglas. Erst bei 105° C trat die für Triterpensaponine charakteristische Rotfärbung ein,

39) W. BUTZ, Pharmac. Acta Helvetiae 20, 296 (1945).

40) N. L. DUTTA, Nature (London) 175, 85 (1955).

41) C. LIEBERMANN u. C. BURCHARD, Ber. dtsh. chem. Ges. 18, 1804 (1885).

die von Steroidsaponinen schon zwischen 30-60° C gegeben wird. (Reaktion nach T. KARIYONE und Y. HASHIMOTO⁴²).

Diese Reaktionen deuten beide auf ein Triterpensaponin.

Fällungsreaktion mit Cholesterin

Als weiteren Beweis untersuchten wir die Fällbarkeit des Saponins mit Cholesterin. Steroidsaponine bilden bevorzugt Fällungsreaktionen mit Cholesterin⁴³, während Triterpensaponine nur zum Teil gefällt werden. Zeigt nun das durch Cholesterin gefällte Saponin keine Hämolyseerscheinung mehr, so liegt eindeutig ein Steroidsaponin vor. Im anderen Fall handelt es sich um ein Triterpensaponin.

Wir brachten deshalb eine äthanolische Lösung unseres Saponins mit einer ebenfalls äthanolischen Cholesterinlösung zusammen. Innerhalb von drei Stunden war keine Fällung eingetreten. Ein Teil der obigen Lösung wurde nun auf ein Rundfilter aufgetragen und nach dem Trocknen mit Blutlösung besprüht. Es kam erneut zur Hämolyse.

Damit war die Zugehörigkeit des Herniariasaponins zur Gruppe der Triterpene erwiesen.

5) Versuche zur Strukturaufklärung des Saponins und Sapogenins

Die durch Äthanol-fällung der methanolischen Extraktlösung erhaltene und durch Umkristallisation aus Methanol gereinigte Substanz schmolz bei 248-251° C.

Sie zeigte die für fast alle Saponine charakteristische Bluthämolyse und reagierte mit alkalischer natriummetaperjodathaltiger Kaliumpermanganatlösung unter Braunfärbung.

Die Substanz erwies sich papierchromatographisch als einheitlich und konnte auf Grund von Farb-, Fällungs- und Hämolysereaktionen (wie oben beschrieben) als Triterpensaponin identifiziert werden.

42) T. KARIYONE u. Y. HASHIMOTO, Experientia (Basel) 9, 136 (1953).

43) L. KOFLEER u. H. RAUM, Biochem. Z. 219, 335 (1930).

Das gewonnene Herniariasaponin liegt in der Droge in glykosidischer Bindung vor, denn bei der salzsauren Hydrolyse am Rückflußkühler konnte ein schwer wasserlösliches Aglykon gewonnen werden.

Identifizierung der Zucker

Mit dem Hydrolysenfiltrat führten wir nach Neutralisation der Säure und positivem Ausfall der Reduktionsprobe nach Fehling die Zuckerbestimmung papierchromatographisch durch. Die im System Pyridin-Essigester-Wasser (1+2+2) erhaltenen Chromatogramme zeigten nach Besprühen mit Anilin-Phthalsäurereagenz und Trocknen bei 110° C drei braune Flecken, die mit Glucose (R_f 0,46), Rhamnose (R_f 0,64) und Galaktose (R_f 0,38) als Testsubstanz im R_f -Wert übereinstimmten. Qualitativ stimmt der Zuckeranteil mit einer Reihe von Saponinen überein, die in der Natur als Trisaccharide vorkommen.

Darstellung des Sapogenins

Das durch salzsaure Hydrolyse des Herniariasaponins erhaltene Aglykon ist vermutlich das zum Saponin gehörige Sapogenin. Da es von schwärzlichbrauner Farbe war und sich bei der Schmelzpunktsbestimmung nicht als rein erwies, wurde in Vorversuchen nach Reinigungsverfahren gesucht. Wir stellten dabei fest, daß die Substanz schwer wasserlöslich und gut ätherlöslich war und in wässriger Alkalilauge und Sodalösung eine gute, in wässriger Natriumbikarbonatlösung eine geringere Löslichkeit besaß.

Es wurde daher das Sapogenin in einem kleinen Soxhlet mit Diäthyläther extrahiert und die braungefärbte Lösung mit Aktivkohle entfärbt. Mit geringen Mengen n-Natronlauge ausgeschüttelt, ging das Aglykon in die wässrig-alkalische Phase über und bildete beim Stehen im Eisschrank ein halbfestes Natriumsalz. Dieses wurde abzentrifugiert und der Reinigungsprozeß wiederholt. Schließlich schieden wir das Sapogenin aus der alkalischen Lösung mit Salzsäure ab. Die weitere Reinigung erfolgte über das Azetylprodukt durch Azetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Aus dem Azetylsapogenin (Schmelzpunkt 187° C) wurden die

Azetylgruppen durch Kalilauge abgespalten und das freie Aglykon aus methanolisch-wässriger Lösung kristallisiert.

Identifizierung des Sapogenins

Wir versuchten nun, einen näheren Einblick in die Konstitution des Triterpensapogenins zu erhalten und führten dazu verschiedene Reaktionen durch.

Prüfung auf freies Karboxyl

Wir hatten bereits festgestellt, daß das fast wasserunlösliche Herniariasapogenin in wässrigen Lösungen von Natriumhydroxyd, Natriumkarbonat und Natriumbikarbonat löslich ist und ein Natriumsalz liefert. Durch die Löslichkeit in Natronlauge kann nicht entschieden werden, ob im Molekül nur phenolische Hydroxylgruppen oder auch Karboxylgruppen vorhanden sind. In Natriumkarbonat und Natriumbikarbonat sind dagegen nach J. HOUBEN und Th. WEYL⁴⁴⁾ nur Stoffe mit Karboxylgruppen löslich, ausgenommen Phenole, deren Hydroxylgruppen mehrere negative Substituenten in Nachbarstellung besitzen (z.B. o,o,p,Trinitrophenol). Da dieser letzte Fall in unserem Molekül kaum wahrscheinlich ist, können wir mit einer oder mehreren Karboxylgruppen rechnen.

Prüfung auf Aldehyd

Mit fuchsinschwefliger Säure (Reagenz nach Schiff DAB 6) wurde auf Aldehydgruppen geprüft. Eine auftretende Violettfärbung schloß das Vorhandensein einer Aldehydgruppe im Molekül nicht aus. Wir suchten daher die Bisulfitverbindung des Sapogenins zu erhalten. Durch Mischen einer gesättigten methanolischen Natriumbisulfitlösung mit einer methanolischen Sapogeninlösung erhielten wir nach 24stündigem Stehen weiße Kristalle der Bisulfitverbindung. Diese schmolzen bei 338° C unter Zersetzung.

Somit ist das Vorhandensein einer Aldehydgruppe im Molekül sicher.

44) J. HOUBEN u. Th. WEYL, Methoden der organischen Chemie, Stuttgart 1953, Bd. II, S. 488.

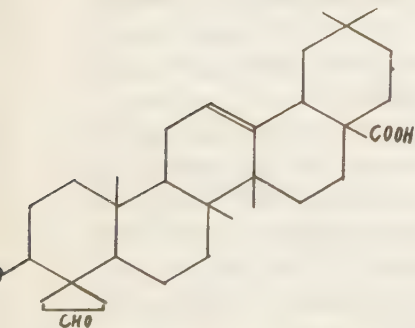
Nach Angaben von K. PAECH und M. V. TRACEY⁴⁵⁾ sind bisher zwei Triterpensapogenine bekannt, die gleichzeitig eine Aldehyd- und Karboxylgruppe enthalten, nämlich das Gypsogenin⁴⁶⁾ und die Quillajasäure⁴⁷⁾.

Gypsogenin ist eine von A. W. van der HAAR⁴⁶⁾ aus *Gypsophila paniculata* (Caryophyllaceae) und anderen Gypsophilaarten und von C. A. R. KON und H. R. SOPER⁴⁸⁾ aus *Saponaria officinalis* (Caryophyllaceae) isolierte $\Delta^{12,13}$ 2-oxy-23-(oder 24)oxooleanen-28-säure der Formel IV. Quillajasäure wurde zum erstenmal von D. F. ELLIOT und C. A. R. KON⁴⁷⁾ aus der Rinde von *Quillaja saponaria* (Rosaceae) gewonnen und ist eine $\Delta^{12,13}$ 2,16,dioxy-23-(oder 24)-oxooleanen-28-säure der Formel V. Beide Säuren unterscheiden sich voneinander nur durch eine Hydroxylgruppe, sie gehören aber beide zur Gruppe der pentacyclischen Triterpene.

Formel IV

Gypsogenin

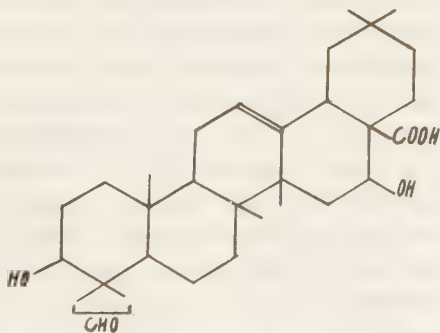
$\Delta^{12,13}$ 2-oxy-23(oder24)oxo-
oleanen-28-säure nach K.
PAECH und M. V. TRACEY⁴⁵⁾



Formel V

Quillajasäure

$\Delta^{12,13}$ 2,16-dioxy-23(oder24)
oxo-oleanen-28-säure nach
K. PAECH und M. V. TRACEY⁴⁵⁾



-
- 45) K. PAECH u. M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 115.
 46) A. W. van der HAAR, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **46**, 28 (1927).
 47) D. F. ELLIOT u. C. A. R. KON, *J. chem. Soc. (London)* **30** (1939).
 48) C. A. R. KON u. H. R. SOPER, *J. chem. Soc. (London)* **617** (1940).

Schmelzpunkte von Gypsogenin, Quillajasäure und Herniariasaponin

Wir verglichen daher zunächst die Schmelzpunkte dieser Substanzen. Gypsogenin schmilzt nach Literaturangaben⁴⁹⁾ bei 269-271° C, Quillajasäure bei 290-292° C⁵⁰⁾, das von uns aus *Herniaria* isolierte Sapogenin bei 286-288° C.

Zur Entscheidung darüber, ob unser *Herniariasapogenin* mit einer dieser Sapogenine identisch ist, stellten wir Gypsogenin durch Hydrolyse aus *Saponium purum* "Merck" (aus *Gypsophila*-arten), Quillajasäure nach einer von D. F. ELLIOT⁵⁰⁾ angegebenen Vorschrift aus *Cortex Quillajae* dar.

Papierchromatographie von Gypsogenin, Quillajasäure und Herniariasapogenin

Papierchromatographisch erwies sich unser *Herniariasapogenin* (R_f 0,92, System: Butanol-Eisessig-Wasser) mit Quillajasäure übereinstimmend, während Gypsogenin einen etwas höheren R_f -Wert zeigt (R_f 0,95).

Darstellung der Azetate von Quillajasäure und Herniariasapogenin

Zur weiteren Charakterisierung versuchten wir die Darstellung der Azetate. Quillajasäurediazetat, das wir durch Azetylierung des in Pyridin gelösten Quillajasapogenins mit Essigsäureanhydrid darstellten, schmolz bei 187° C und zeigte mit unserem auf gleiche Weise hergestellten *Herniariasapogenin*azetat keine Schmelzpunktsdepression. Wir können damit den erst kürzlich (1953) von L. RUZICKA⁵¹⁾ für Quillajasäurediazetat gefundenen Schmelzpunkt von 185-190° C bestätigen. L. Ruzicka referiert auch den von D. F. ELLIOT und C. A. R. KON⁵⁰⁾ 1939 für ein Quillajasäurediazetat erhaltenen Schmelzpunkt von 250° C. Der hohe Schmelzpunkt kann möglicherweise auf eine nicht vollständige Azetylierung der beiden Hydroxylgruppen zurückzuführen sein.

49) A. W. van der HAAR, Rec. trav. chim. Pays-Bas 46, 28 (1927).

50) D. F. ELLIOT u. C. A. R. KON, J. chem. Soc. (London) 1, 30 (1939).

51) L. RUZICKA, B. BISCHOF, E. C. TAYLOR, A. MEYER u. O. JEGGER, Collect. Czechoslov. chem. Commun. 15, 893 (1951).

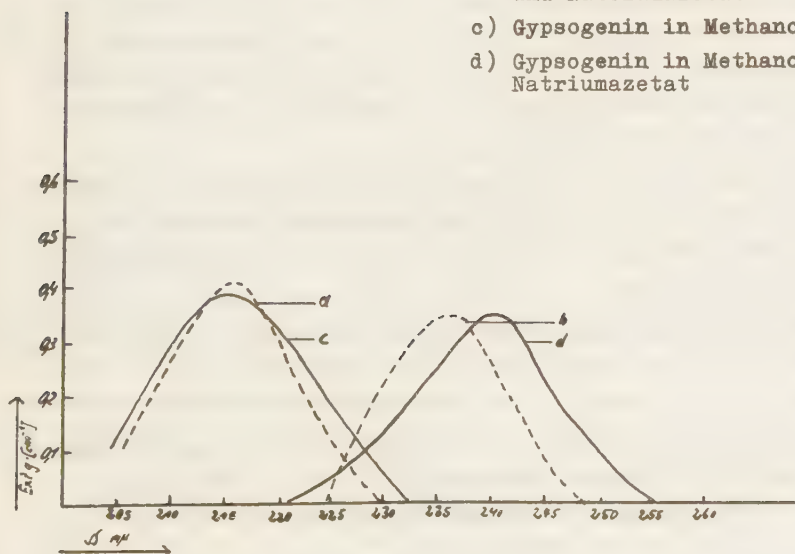
Spektren

Da die UV-Spektren (s. Abb. VII) bei Gypsogenin, Quillajasäure und Herniariasapogenin (gemessen in methanolischer Lösung) übereinstimmend ein Maximum bei 215 m μ aufweisen und damit keine Unterscheidungsmöglichkeit lieferten, nahmen wir eine Messung in Natriumazetat gesättigter methanolischer Lösung vor. Bei Gypsogenin kam es dabei zu einer Maximumverschiebung um 23 m μ (238 m μ), die bei Herniariasapogenin und Quillajasäure nur 18 m μ betrug (233 m μ). Wir nehmen an, daß die geringe Verschiebung bei Quillajasäure bzw. Herniariasapogenin auf die Nachbarstellung der Hydroxylgruppe zur Karboxylgruppe zurückzuführen ist.

Abb. VII

UV-Spektren von Gypsogenin und Herniariasapogenin

- a) Herniariasapogenin in Methanol
- b) Herniariasapogenin in Methanol und Natriumazetat
- c) Gypsogenin in Methanol
- d) Gypsogenin in Methanol und Natriumazetat



Nachdem die Schmelzpunkte des Herniariasapogenins und seines Azetats mit denen der Quillajasäure übereinstimmten und auch papierchromatographische und UV-spektrophotometrische Messungen zeigten, daß unsere Substanz sehr wahrscheinlich mit Quillajasäure identisch ist, mußte es möglich sein, durch Vergleich der IR-Spektren eine endgültige Entscheidung zu treffen.

Wir fertigten sowohl von Quillajasäure und Gypsogenin als auch von unserem isolierten Sapogenin IR-Spektren an (s. Abb. VIII, IX und X, S. 43) und verglichen sie miteinander. Dabei ergab schon der bloße Vergleich des Kurvenverlaufs, daß Herniariasapogenin mit Quillajasäure und nicht mit Gypsogenin identisch ist. In beiden Sapogeninen findet man die Bande der freien Karboxylgruppe im Bereich zwischen 1690 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} , die man bei pentacyclischen Triterpenen (gemessen in Chloroform) nach A. R. H. COLE und D. W. THORNTON⁵²⁾ bei 1714 cm^{-1} findet. Auffallend ist, daß diese Bande bei der Quillajasäure bzw. bei Herniariasapogenin längerwelliger liegt als beim Gypsogenin. Gypsogenin hat seine COOH-Bande bei 1740 cm^{-1} , Quillajasäure bzw. Herniariasapogenin bei 1700 cm^{-1} . Diese Verschiebung bei der Quillajasäure erklären wir mit der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen den benachbart liegenden Hydroxyl- und Carboxylgruppen.

Über die Zuckerstellung kann nichts eindeutiges ausgesagt werden. Vermutlich sind wegen der sterischen Hinderung der benachbarten Carboxyl- und Hydroxylgruppe sämtliche Zucker am C₂-Hydroxyl gebunden.

Beim Quillajasaponin (aus Cortex Quillajae) sind Natur und Zahl der Zucker nicht bekannt, und wir können daher nicht entscheiden, ob dieses mit dem Herniariasaponin übereinstimmt.

Damit handelt es sich bei dem aus Herba Herniariae gewonnenen Saponin mit größter Wahrscheinlichkeit um das Glucogalacto-Rhamnosid der Quillajasäure der Formel VI (s. S. 44).

52) A. R. H. COLE, D. W. THORNTON: "Infrared Spectra of Natural Products. V. The Characterisation of Carbonylic Groups in Pentacyclic Triterpenoids", J. chem. Soc. (London) (im Druck).

Abb. VIII

IR-Spektrum von
Gypsogenin

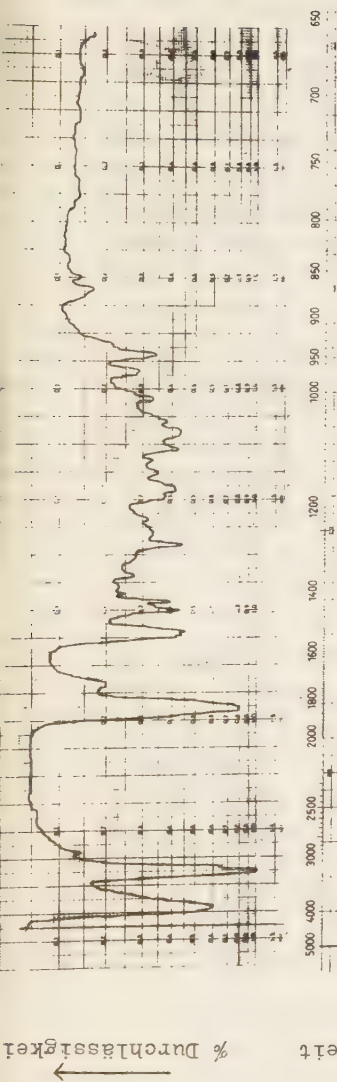


Abb. IX

IR-Spektrum von
Herniariasapogenin

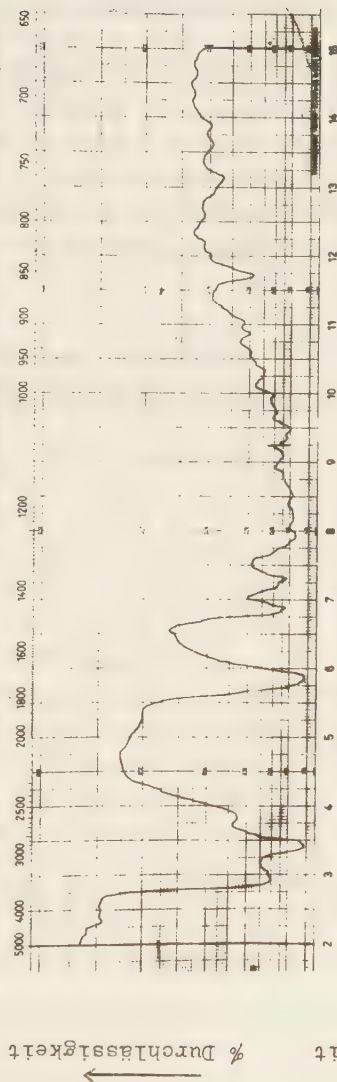


Abb. X

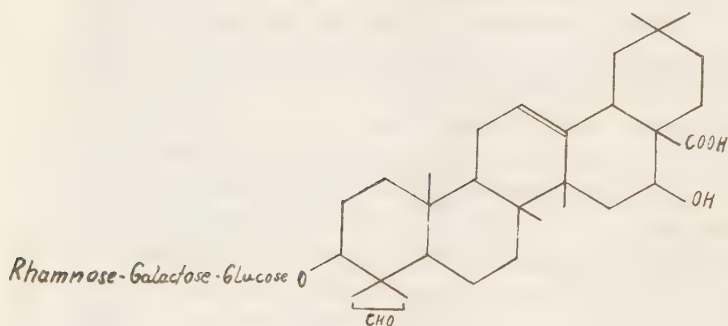
IR-Spektrum von
Quillajäure



Die Isolierung der Quillajasäure aus Herba Herniariae ist insofern bemerkenswert, als sich die anderen in der Familie der Caryophyllaceae aufgeklärten Saponine (Gypsophila-Arten und Saponaria officinalis) vom Gypsogenin ableiten. Inwieweit der eine oder andere Saponintyp für die einzelnen Arten oder Gattungen ein Characteristicum darstellt, bliebe noch offen. Es wird Aufgabe weiterer Arbeiten sein, den genauen hämolytischen Index, sowie die Toxizität des Herniariasaponins für Fische festzustellen.

F o r m e l VI

Quillajasäure-glucogalactorhamnosid



C. Experimenteller Teil

1) Isolierung der Hauptflavonglykoside I und II

a) Extraktbereitung

600 g getrocknete oberirdische Teile von *Herniaria glabra*, die im September 1956 in einem Münchener Garten gesammelt worden waren, wurden im Soxhlet in Anteilen von je 300 g mit 2 l Chloroform bis zur Farblosigkeit ausgezogen. Nach dem Abpressen und Trocknen der vorextrahierten Droge erfolgte eine methanolische Extraktion mit 2 l im Soxhlet bis zur Farblosigkeit der ablaufenden Flüssigkeit. Aus der Lösung wurde Methanol abdestilliert, der Rückstand in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Am nächsten Morgen konnte aus der filtrierten Lösung das noch enthaltene Chlorophyll mit 1,2 l Chloroform in Anteilen von je 100 ml ausgeschüttelt werden. Die dabei jeweils auftretende starke Emulsionsbildung wurde durch Zusatz von 5 Volumteilen Äthanol auf 100 ml Chloroform aufgehoben.

b) Papierchromatographie

Bei der chromatographischen Untersuchung der *Herniaria*-inhaltsstoffe wurde stets die absteigende Methode mit einer Apparatur der Firma Bender u. Hobein (große Chromatographierkammer) und Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b angewandt. Als Lösungsmittel dienten die Oberphasen folgender Lösungsmittelsysteme:

1. Essigester-Ameisensäure-Wasser (10+2+3)

für die Chromatographie der Flavonglykoside und ihrer Aglykone, der Cumarine und Saponine,

2. Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5)

für die Flavonglykoside, Saponine und Cumarine. Die Flavonglykoside zeigten vor allem in verunreinigter Lösung in diesem System nicht den guten Trenneffekt des 1. Lösungsmittelsystems.

3. Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5)

für die Aglykone der Flavonglykoside,

4. Pyridin-Essigester-Wasser (1+2+2)

für die Chromatographie der Zucker.

Die Lösungen der reinen Glykoside, Cumarine, Saponine in Methanol, oder die gereinigten Extraktlösungen wurden auf der Startlinie, 3 cm vom Rand eines Chromatogrammbogens (60 x 60 cm) entfernt, in Abständen von 3 cm aufgetragen. Soweit Bezugssubstanzen zur Verfügung standen, ließen wir deren Lösungen zum Vergleich der R_f -Werte mitlaufen. Auf dem fertigen Chromatogramm waren die Flavonglykoside im UV-Licht als dunkelbraune Flecke zu erkennen, die Aglykone leuchteten gelblich, die Saponine und Cumarine bläulich. Nach Besprühen mit Metallsalzlösungen des Bleis (Liquor Plumbi subaceticus DAB 6) und des Aluminiums (5% methanolische Aluminiumsulfatlösung) traten die Flecke noch deutlicher hervor und zeigten zum Teil charakteristische Farbunterschiede.

Die Papierchromatographie der Zucker erfolgte durch Auftragen der neutralisierten und auf einige ml eingedampften Hydrolysenfiltrate. Die getrockneten Zuckerchromatogramme wurden mit einer Lösung von 1,63 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol besprüht. Nach dem Trocknen bei 110° C hoben sich die braunen bis braunvioletten Zuckerflecke schon bei Tageslicht, verstärkt im UV-Licht, von dem weißen Papier ab.

c) Darstellung eines Mischkristallisats der Flavonglykoside I und II

Der unter a) erhaltene wässrige, chlorophyllfreie Extrakt (400 ml) wurde mit 2 l wassergesättigtem Butanol in Anteilen von je 200 ml ausgeschüttelt. Der Rückstand war bei der papierchromatographischen Untersuchung flavonfrei und konnte verworfen den. Die Ausschüttelungen wurden im Vakuum abdestilliert und

der butanolfreie Rückstand in 500 ml destilliertem Wasser gelöst.

Mit diesem gereinigten Herniariaauszug führten wir 60 Ausschüttelungen mit je 200 ml wassergesättigtem Äthylazetat durch, filtrierten und destillierten das Lösungsmittel ab. Der in 100 ml Wasser gelöste Rückstand wurde mit Hilfe einer 10 ml Pipette gleichmäßig auf eine Perlonsäule aufgetragen. Die Bereitung der Perlonsäule erfolgte durch Anschlännen von 75 g Perlonpulver (Badische Anilin- und Sodafabrik) in 250 ml destilliertem Wasser und Eintragen in eine Glasröhre von 3,5 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 35 cm. Die Glasröhre war am unteren Ende mit einer Siebplatte abgeschlossen und verjüngte sich von dieser Stelle aus zu einem Tropfhahn.

Mit etwa 800 ml Wasser perkoliert, bewegten sich die beiden Flavonglykoside in einer Zone in Richtung zum Säulenboden (im UV-Licht als dunkelbraune Zone gekennzeichnet). Nachdem sie etwa die Säulenmitte erreicht hatten, wurde mit 700 ml Methanol eluiert und 500 ml glykosidhaltiges Eluat aufgefangen. Aus dem in 10 ml Methanol und 40 ml Wasser gelösten Rückstand des methanolischen Eluats erhielten wir nach 3tägiger Kristallisation 140 mg Mischkristallizat, aus der Mutterlauge nach 8 Tagen weitere 32 mg, insgesamt 172 mg. Bei der papierchromatographischen Prüfung bestand dieses Mischkristallizat aus etwa gleichen Teilen Flavonglykosid I und II.

d) Trennung des Mischkristallisats

200 g Kieselgur "Merck" (mit Salzsäure gereinigt und mit destilliertem Wasser gewaschen) wurden mit 400 ml Oberphase aus einem Gemisch von Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (100+3+25) angeschlämmt und 3 Tage in einem gut verschlossenem Gefäß stehen gelassen. Danach konnte die überstehende Flüssigkeit abgegossen und Kieselgur mit 200 g Zellulosepulver (Schleicher & Schüll 123 a) unter Zusatz weiterer Oberphase gemischt werden. Nun trugen wir das Gemisch in eine 4 cm dicke Säule bis zu einer Höhe von ca 35 cm ein und ließen das überstehende Lösungsmittel ab,

jedoch nur soweit, daß sich innerhalb der Säule keine Luftblasen bilden konnten.

In der Zwischenzeit hatten wir 12 mg reines Mischkristallinat in 2 ml Methanol gelöst, mit Zellulosepulver verrieben, das Lösungsmittel vorsichtig bei 50° C im Trockenschrank abgedunstet und den Rückstand fein verrieben. Diese Anreibung brachten wir vorsichtig und gleichmäßig auf die Säule, bedeckten mit Watte und ließen das Verteilungsgemisch (insgesamt 800 ml Oberphase aus Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser, 100+3+25) vorsichtig auftropfen.

Nach einiger Zeit waren unter der UV-Lampe zwei deutlich voneinander getrennte dunkle Zonen zu erkennen, die sich bei fortgesetzter Laufzeit etwas überlappten. Sie wurden in 19 Fraktionen zu je 30 ml aufgefangen und chromatographiert. 9 Fraktionen ordneten wir dem Flavonglykosid I zu, 7 enthielten Flavonglykosid II und 3 waren Mischfraktionen.

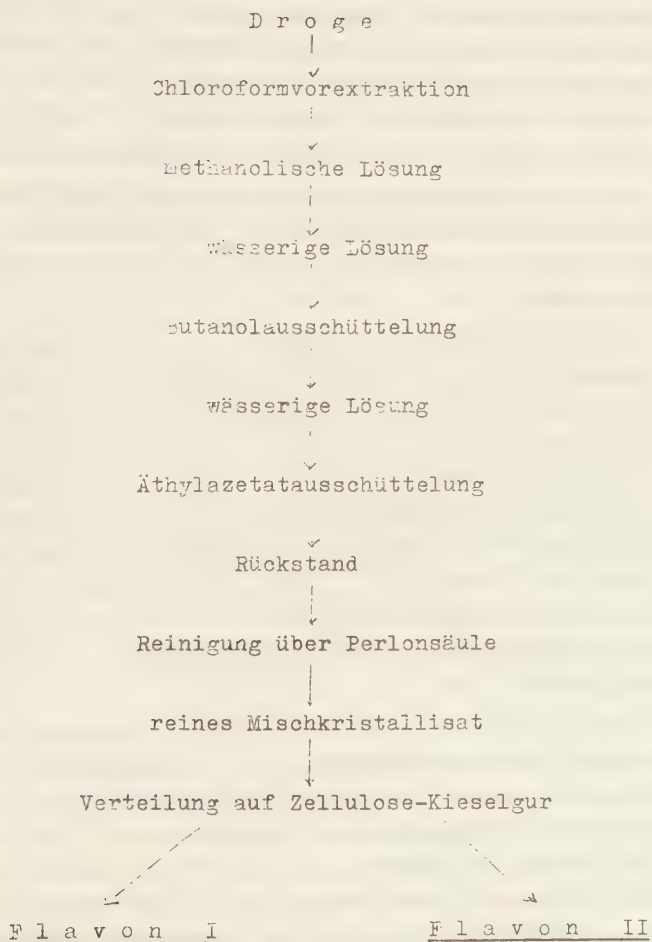
Den Abdampfungsrückstand der flavonglykosid-I-haltigen Fraktionen lösten wir in 25 ml destilliertem Wasser, brachten die Lösung auf ein 90° C heißes Wasserbad und ließen langsam erkalten. Die dabei sich bildenden Impfkristalle reichten aus, um nach 24 Stunden Flavonglykosid I in kristalliner Form zu erhalten.

Flavonglykosid II konnte durch zweimalige Kristallisation aus 10 ml Methanol-Wassermischung (4+6) im Lössschrank rein erhalten werden.

Der Anteil der pro Säule gewonnenen Flavonmenge betrug bei Flavon I 5 mg, bei Flavon II 4 mg, der Rest ging durch Adsorption an Kieselgur-Zellulose und als Mischzone verloren.

Aus 12 Säulen konnten 58 mg Hauptflavonglykosid I und 45 mg Flavonglykosid II in schmelzpunktreiner, kristalliner Form erhalten werden.

Schematische Darstellung der Flavontrennung I + II



2) Isolierung der Nebenflavonglykoside III und IV

5 kg Herba Herniariae (Firma Caesar & Loretz, Ernte 1956) wurden mit 12 l Methanol 8 Tage lang mazeriert, abgepresst und der Rückstand mit 8 l destilliertem Wasser im Siccotopf einer zweistündigen Heißextraktion bei 110° C unterzogen. Der nach dem Abdestillieren des Methanols verbleibende Rückstand wurde mit dem wässerigen Drogenauszug vermischt und auf dem Wasserbad bis auf ein Volumen von 500 ml eingedampft. Die filtrierte Lösung konnte zur Entfernung des Chlorophylls 10mal mit je 200 ml Chloroform unter Zusatz von 5% Äthanol ausgeschüttelt werden.

Der chlorophyllfreie Herniariaauszug wurde dann 10mal mit je 400 ml wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt, Butanol im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 300 ml destilliertem Wasser gelöst.

In der Zwischenzeit hatten wir in zwei Glasröhren von 4 Durchmesser je 75 g mit Wasser angeschlammtes Perlonpulver gegeben. Auf jede dieser Glassäulen brachten wir 150 ml der gereinigten Extraktlösung und eluierten mit 800 ml destilliertem Wasser. Die Flavonglykoside I und II zeigten dabei eine mäßig schnelle Abwärtsbewegung auf der Säule, während die Flavonglykoside III und IV kurz hinter der Lösungsmittelfront wanderten. Der erhaltene Vorlauf (ca. 130 ml) war flavonfrei und wurde verworfen. Die anschließenden 7 Fraktionen zu je 100 ml enthielten die Flavonglykoside III und IV angereichert, vermischt mit etwas Flavonglykosid I und II.

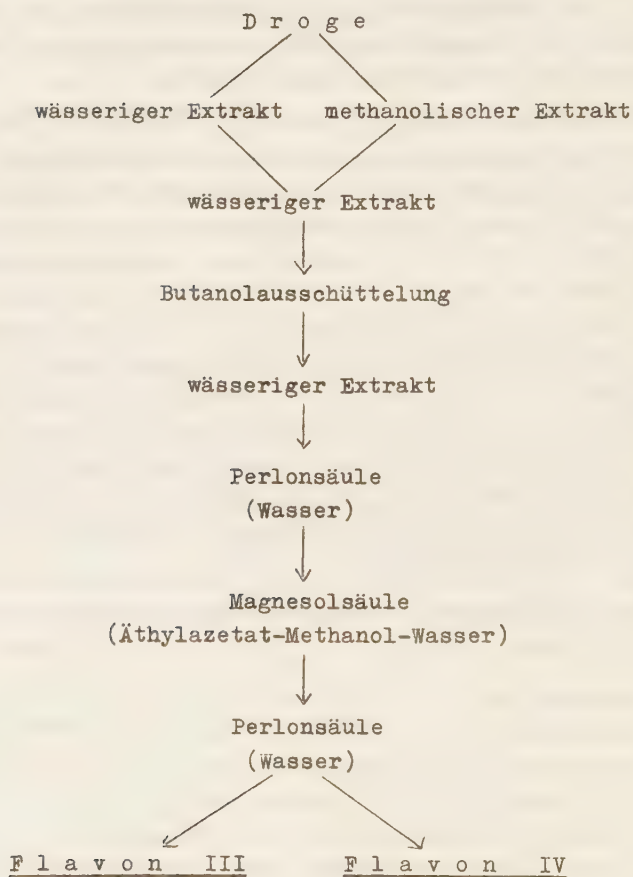
Das wässerige Eluat wurde auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 75 ml vergälltem Äthanol und 75 ml Azeton gelöst. Eine dabei auftretende starke Trübung wurde unberücksichtigt gelassen. Mittels einer 10 ml Pipette trug wir die Lösung gleichmäßig auf eine 18 cm hohe und 4 cm dicke Magnesolsäule auf (Anschlammung von 100 g Magnesol in 120 ml Azeton). Entwickelt wurde mit der Oberphase eines Gemisches aus Äthylazetat-Methanol-Wasser (90+10+30). Unter der UV-Lampe waren nach einiger Zeit zwei Zonen zu erkennen. Die in dem Gemisch

leichter lösliche und damit auf der Säule schneller laufende Zone war, wie sich papierchromatographisch ergab, mit den Flavonglykosiden I und II identisch. Sie wurde mit ca. 400 ml Lösungsmittel aus der Säule eluiert. Die zweite Zone, die sich vom Startpunkt nur einige Zentimeter wegbewegte, konnte nach dem Ausstossen der Magnesolsäule mit 300 ml Methanol herausgelöst werden. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand in 100 ml Wasser gelöst. Die papierchromatographische Prüfung ergab die Flavonglykoside III und IV.

Zur Trennung der Flavonglykoside III und IV fand eine Perlonssäule Verwendung, die die gleiche Beschaffenheit hatte, wie die zur Anreicherung der Nebenflavone benützte. Mittels einer Pipette wurde die wässrige Flavonlösung auf die Säule aufgetragen und mit reinem Wasser entwickelt. Nach einiger Zeit zeigten sich im UV-Licht zwei Zonen, die sich im Mittelteil etwas überlappten. Sie wurden in 18 Fraktionen zu je 30 ml aufgefangen. Die erste Fraktion erwies sich papierchromatographisch als reines Flavonglykosid III, die nächsten 7 Fraktionen bestanden aus Flavonglykosid III, das auf dem Chromatogramm mit einer schwach bläulich fluoreszierenden Substanz gemischt war, die sich als Saponin erwies. Die nächsten 2 Fraktionen waren Mischfraktionen, die weiteren 6 Fraktionen saponinhaltiges Flavonglykosid IV und die letzten 2 reines Flavonglykosid IV.

Die sich entsprechenden Glykoeffraktionen wurden eingedampft und in Methanol gelöst.

Extraktionsschema der Nebenflavone III und IV



3) Identifizierung der Flavonglykoside

a) Schmelzpunkte

Alle angegebenen Schmelzpunkte sind korrigiert. Sie wurden mit dem Mikro-Schmelzpunktsapparat nach Kofler gemessen.

b) Papierchromatographie

Die praktische Ausführung der Papierchromatographie ist bereits auf Seite 45 beschrieben. In den folgenden Tabellen sind die R_F -Werte der Flavonglykoside, ihrer Aglykone und ihrer Zucker in verschiedenen Lösungsmittelsystemen aufgeführt.

T a b e l l e 3

Papierchromatographischer Vergleich der Haupt- und Nebenglykoside

Flavonglykosid	R_F -Wert im Äthyl- azetatgemisch	R_F -Wert im Butanolgemisch
I	0,38	0,37
II	0,36	0,35
Rutin	0,36	0,35
III	0,32	0,32
IV	0,28	0,29

T a b e l l e 4

Papierchromatographischer Nachweis der Hydrolysenprodukte von Glykosid I-IV

Aglykon von Flavonglykosid	R_F -Wert im Isopro- panolgemisch	R_F -Wert im Butanolgemisch
I	0,28	0,72
III	0,28	0,72
Isorhamnetin	0,28	0,72
II	0,19	0,54
IV	0,19	0,54
Quercetin	0,19	0,54

T a b e l l e 5

Papierchromatographischer Nachweis der Zucker

Testzucker: Glucose $R_F = 0,46$

Rhamnose $R_F = 0,63$

Zucker von Flavonglykosid	R_F -Wert in Pyridin-Äthyl- azetat-Wasser
I	0,46 und 0,63
II	0,46 und 0,63
III	0,46 und 0,63
IV	0,46

c) Hydrolysen

α) Qualitative Hydrolyse:

5-10 mg Flavonglykosid wurden in 10 ml Methanol gelöst, 2 ml 25%ige Salzsäure hinzugegeben und 60 Minuten auf dem siedenden Wasserbad am Rückflußkühler hydrolysiert. Dann gaben wir 40 ml destilliertes Wasser hinzu, filtrierten das ausgeschiedene Aglykon ab und reinigten es durch mehrfache Umkristallisation aus Methanol-Wasser.

Das aglykonfreie Hydrolysenfiltrat enthielt die Zucker. Zur Entfernung der störenden Säuren wurde es über einen Säureaustauscher geschickt. Als solcher fand Dowex, Type 2 (Vernetzung 8, Siebzahl 20-50 mesh)*) Verwendung, der in eine 1 cm dicke und 30 cm hohe Glasröhre eingefüllt, mit 400 ml 70%igem natriumbikarbonatgesättigtem Alkohol aktiviert (bis zum Auftreten einer schwach alkalischen Reaktion) und mit 70%igem Äthanol neutral gewaschen worden war.

Nach dem Auftragen der 40 ml salzsauren Lösung erfolgte der Austausch der Wasserstoffionen gegen Natriumionen. Mit 10 ml destilliertem Wasser wurde nachgewaschen. 40 ml saurefreien Vorlauf dampften wir auf 1 ml ein und führten damit die papierchromatographische Untersuchung durch.

*) Hersteller: Dow Chemical Company, Midland, Michigan, U.S.A.

β) Quantitative Hydrolyse:

Ca. 10 mg des bei 120° C bis zur Gewichtskonstanz getrockneten und gewogenen Flavonglykosids (siehe Tabelle 6) wurden in 3%iger Schwefelsäure gelöst und 1 Stunde im siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Nach 18stündiger Kühlung im Eisschrank filtrierten wir das Aglykon mit einer bei 120° C getrockneten und gewogenen Mikrofilternutsche (A₂) ab, trockneten bis zur Gewichtskonstanz bei 120° C und wogen.

T a b e l l e 6

Quantitative Hydrolysen

Flavonglykosid	hydrolysiert mit	Einwaage mg	Ausbeute mg %	berechnet %
I	15 ml 3% H ₂ SO ₄	12	6,52 54,3	56
II	15 ml 3% H ₂ SO ₄	10,1	5,12 51	54,9

γ) Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode:

Zur quantitativen Hydrolyse der nicht kristallin erhaltenen Flavonglykoside III und IV verwendeten wir saponinfreie Fraktionen und stellten durch Verdünnen mit Methanol Stammlösung her, deren Extinktion bei 370 mμ zwischen 0,5 und 0,7 lag. 2 ml dieser Stammlösung wurden mit 4 ml n/2 Schwefelsäure 1 Stunde auf dem Wasserbad am Rückflußkühler gekocht, abgekühlt und mit Methanol im 10 ml Meßkölbchen aufgefüllt. Die Konzentration dieser aglykonischen Lösung konnte dann mit Hilfe eines speziellen Extinktionskoeffizienten nach der für das Lambert-Beersche Gesetz zutreffenden Formel berechnet werden

$$c = \frac{E}{E_{\text{spez.}} \cdot d}$$

c = Konzentration g/l; E = Extinktion, gemessen; d = Schichtdicke (cm).

Der spezielle Extinktionskoeffizient beträgt für Iso-
rhamnetin bei 370 m μ 67,0⁵³⁾, für Quercetin bei 369 m μ 76,0.
Bei der Messung des Hydrolysenproduktes von Flavonglykosid III
(Isorhamnetin) erhielten wir bei einer Schichtdicke von 1 cm
eine Extinktion von 0,88. Für das Aglykon von Flavonglykosid
IV (Quercetin) betrug die gemessene Extinktion 0,70.

Die erhaltenen Werte wurden in die Gleichung eingesetzt,
mußten jedoch mit 5 multipliziert werden, da die 2 ml Stammlö-
sung bei der Hydrolyse auf 10 ml verdünnt wurden. Somit betra-
gen die Aglykonkonzentrationen in 2 ml Stammlösung für

Flavonglykosid III

$$c = \frac{0,88 \times 5}{67,0 \times 1} = 65,6 \gamma$$

Flavonglykosid IV

$$c = \frac{0,70 \times 5}{76,0 \times 1} = 46,8 \gamma.$$

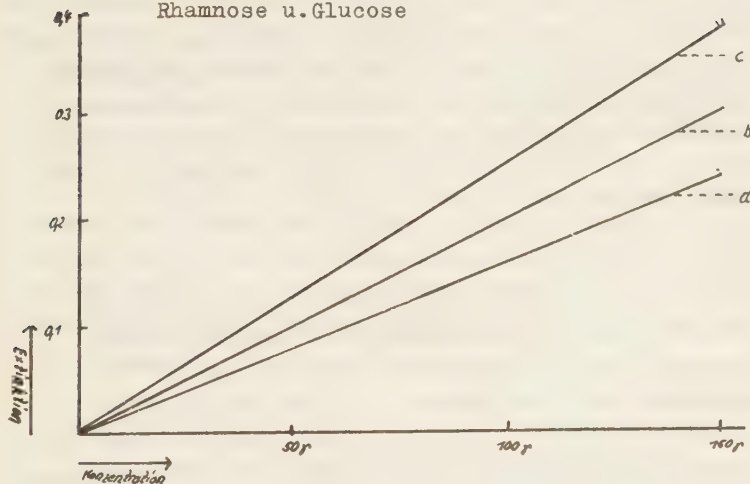
Zur Zuckerbestimmung pipettierten wir weitere 2 ml der
methanolischen Ausgangslösung ab, dampften auf dem Wasserbad
zur Trockene ein und lösten den Rückstand in 5 ml destilliertem
Wasser. Diese Lösung vermischten wir vorsichtig mit 10 ml An-
thronlösung (0,2 g Anthron in 100 ml 96%iger Schwefelsäure).
Nach 15 Minuten wurde bei 620 m μ gegen eine Blindprobe von 10 ml
Anthronlösung + 5 ml destilliertem Wasser gemessen.

Die erhaltenen Extinktionen verglichen wir mit einer
Zuckereichkurve, die aus verschiedenen konzentrierten Lösungen
von authentischer Rhamnose und Glucose im Anthronreagenz ange-
fertigt worden war.

53) W. SCHLEMMER, Dissertation, München 1957.

Abbildung XI
Zuckereichkurven

a = Glucose
c = Rhamnose
b = arithm. Mittel aus
Rhamnose u. Glucose



T a b e l l e 7

Glykosid	Aglykonanteil	Zuckeranteil	Glykosidtyp
III	65,6 γ	96 γ	Triglykosid
IV	46,0 γ	69 γ	Triglykosid

δ) Partielle Hydrolyse der Glykoside I und III:

Etwa 2 mg Glykosid I bzw. eine ihnen entsprechende Menge des Abdampfungsrückstandes der methanolischen Lösung von Glykosid III wurden in 2,5 ml Cyclohexanol durch kurzes Aufkochen auf dem Asbestdrahtnetz gelöst. Wir fügten 0,8 ml 97%ige Ameisensäure hinzu und erhitzen diese Lösung 9 Stunden lang auf 105-107° C. Nach dem Erkalten wurde die Lösung im System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser chromatographiert.

d) Azetylierung der Aglykone

Wir lösten 10 mg des im Vakuumexsikkator getrockneten Aglykons in einer Mischung von 4 g Essigsäureanhydrid und 5 Tropfen reinem Pyridin. Nach Zusatz von 0,5 g frisch geschmolzenem und gepulvertem Natriumazetat wurde die Lösung 1 Stunde lang am Rückflußkühler auf dem Asbestdrahtnetz erhitzt. Das farblose Reaktionsgemisch gossen wir in 5 ml kaltes Wasser und spülten das Kölbchen mit der gleichen Wassermenge nach. Im Eisschrank kristallisierte das Azetylderivat nach etwa 12 Stunden in farblosen Nadeln aus. Diese wurden zur Reinigung zweimal aus 5 ml 96%igem Äthanol kristallisiert.

T a b e l l e 8

Azetat	Schmelzpunkt	Schmelzpunkt Literatur
Isorhamnetinazetat	205°C	201-206°C
Quercetinazetat	189°C	188-193°C

e) Methylierung der Flavonglykoside I und II

30 mg im Vakuumexsikkator getrocknetes Flavonglykosid wurden in einem 200 ml Rundkolben in 40 ml wasserfreiem Azeton gelöst und 3 g wasserfreies Kaliumkarbonat hinzugefügt. Darauf wurde die Mischung mit 2,5 ml Dimethylsulfat versetzt und auf den Kolben ein Schliffkühler aufgesetzt. Am Ende des Kühlers war ein Calciumchloridrohr angebracht. Die ganze Apparatur stellten wir in einen Wärmepilz und regulierten die Temperatur so, daß die Lösung gerade schwach zum Sieden kam. Die Methylierung wurde kontinuierlich 40 Stunden lang durchgeführt und dann die Reaktionslösung chromatographiert. Auf dem Chromatogramm zeigten sich neben dem vollmethylierten Produkt, das sich durch schwach bläuliche Fluoreszenz auszeichnete, zwei weitere, weniger starke grünlichgelbe Flecken, die wir für partiellmethylierte Produkte ansahen.

Von der Annahme ausgehend, daß alle nicht vollmethylierten Produkte mit einer oder mehreren freien Hydroxylgruppen auf

einer Aluminiumoxydsäule zurückgehalten werden⁵⁴⁾, verwendeten wir für die weitere Reinigung "Aluminiumoxyd annähernd neutral" der Firma Woelm. Die filtrierte Azetonlösung der Methylprodukte wurde durch eine 3 cm hohe und 0,5 cm dicke Aluminiumoxydschicht geschickt. Dabei färbte sich die Aluminiumoxydsäule im ersten Drittel schwach gelblich infolge Adsorption der nicht vollmethylierten Flavone. Die durchgelaufene Lösung erwies sich, wie eine papierchromatographische Nachprüfung ergab, als einheitlich, sie enthielt nur das vollmethylierte Produkt.

Die klare, gelb gefärbte Lösung gossen wir nun in 10 ml Wasser und ließen das Azeton auf dem Wasserbad langsam abdunsten. In den Eisschrank gestellt, schied sich das Methylprodukt in weißen Nadeln ab. Diese wurden mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen, in etwas Azeton gelöst und mit 10 ml 3%iger Salzsäure 40 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert.

Aus der in den Eisschrank gestellten Lösung schieden sich über Nacht weiße Nadeln des Methylproduktes ab. Diese wurden abzentrifugiert und zweimal aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug für das Methylprodukt von Flavonglykosid I ca. 2 mg, für das von Flavonglykosid II ca. 2,9 mg.

T a b e l l e 9

Methylprodukt	Schmelzpunkt	Mischschmelzpunkt
5,7,3',4'-Methoxy-3-oxyflavon	189° C	189-190° C
5,7,3',4'-Methoxy-3-oxyflavon	189° C	189° C

f) Zirkon-Zitronensäuretest

0,2-0,5 mg des zu prüfenden Flavonglykosids bzw. eine entsprechende Menge reiner Lösung wurden in einem Reagenzglas in 10 ml Methanol gelöst. Wir fügten 1 ml 2%ige methanolische

54) L. HÖRHAMMER u. K. H. MÜLLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 288/60, 31 (1955).

Zirkon-4-oxychloridlösung hinzu, wodurch die Lösung eine stark gelbe Farbe mit mehr oder weniger deutlicher grüner Fluoreszenz erhielt. Nach Zusatz von 1 ml einer 2%igen methanolischen Zitronensäurelösung und Verdünnen mit destilliertem Wasser auf 20 ml wurde die Lösung innerhalb einer halben Minute farblos.

Bei der Prüfung der isolierten Flavonglykoside wurden die Zirkonkomplexe durch Zitronensäure gespalten und entfärbt. Die Chelate ihrer Aglykone wurden dagegen nicht zerstört.

Bei den Flavonglykosiden ist demnach die C_3OH -Gruppe glykosidisch gebunden.

g) UV-Spektren

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte im Unicam Quarz-Spektrophotometer SP 500 der Firma Unicam Instruments, Cambridge England.

h) IR-Spektren

900 γ Flavonglykosid I und 920 γ authentisches Narcissin wurden mit je 300 mg Kaliumbromid gemischt und in Form von Präparaten im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 spektroskopiert.

4) Die Cumarine von Herba Herniariae

a) Isolierung der Cumarine

α) Extraktbereitung:

2 x 300 g geschnittenes Bruchkraut (Firma Caesar & Loretz, Ernte 1956) wurden im Soxhlet in Anteilen von 300 g mit 2 l Chloroform bis zur Farblosigkeit des ablaufenden Lösungsmittels ausgezogen. Dann preßten wir die Droge ab, brachten sie erneut in die Soxhletapparatur und extrahierten mit 2 l Methanol. Aus der methanolischen Lösung wurde Methanol abdestil-

liert, der Rückstand in 400 ml Wasser gelöst und mit 2,5 l Chloroform + 5%igem Methanol ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung stellte den chlorophyll- und herniarinfreien gereinigten Auszug dar.

β) Isolierung von Umbelliferon:

Den gereinigten wässrigen Herniariaextrakt (400 ml) brachten wir auf eine mit Wasser angeschlammte Perlonsäule von 4 cm Schichtdicke und 35 cm Höhe und eluierten mit 2 l destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte eine Eluierung mit 300 ml Äthanol, von dem eine Fraktion mit 100 ml aufgefangen wurde. Diese dampften wir auf 10 ml ein und trugen sie erneut auf eine mit Wasser angeschlammte Perlonsäule von 35 cm Höhe und 3 cm Dicke auf. Die anschließende Eluierung erfolgte mit 800 ml 30%igem Methanol, das in Fraktionen zu je 100 ml aufgefangen wurde. Die 6. Fraktion, die Umbelliferon enthielt, wurde auf dem Wasserbad eingedampft, in 10 ml Methanol-Wassergemisch (6+4) gelöst und im Eisschrank kristallisiert. Durch zweimalige Umkristallisation erhielten wir etwa 6 mg reines Umbelliferon.

b) Identifizierung des Cumarins

α) Papierchromatographie:

Die praktische Durchführung der Papierchromatographie ist bereits auf S.45 beschrieben. Im System Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser erhielten wir für Umbelliferon einen R_F -Wert von 0,92 und im System Butanol-Eisessig-Wasser einen R_F -Wert von 0,88.

β) Farbreaktionen:

Eine Lösung von 0,2 mg Umbelliferon in 5 ml äthanolischer Kalilauge (2% Kaliumhydroxyd in 100 ml 96%igem Äthanol) zeigte starke Blaufluoreszenz, die sich im UV-Licht verstärkte.

Dieselbe starke Fluoreszenz konnten wir beim Besprühen des bei der Papierchromatographie erhaltenen Umbelliferonfleckes mit äthanolischer Kalilauge beobachten.

γ) UV-Spektrum:

Die Aufnahme des UV-Spektrums von Umbelliferon erfolgte im Unicam Quarz-Spektrophotometer SP 500 der Firma Unicam Instruments, Cambridge, England.

o) IR-Spektren:

600 γ Umbelliferon (aus Herba Herniariae) und 567 γ authentisches Umbelliferon wurden mit 300 mg Kaliumbromid gemischt und in Form von Preßlingen im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 spektroskopiert.

5) Die Saponine von Herba Herniariae

a) Gewinnung des Saponins

200 g Herba Herniariae (Firma Caesar & Loretz, Ernte 1956) wurden im Soxhlet mit 2 l Chloroform bis zur Farblosigkeit ausgezogen. Nach dem Abpressen und Trocknen der vorextrahierten Droge erfolgte eine methanolische Extraktion mit 2 l im Soxhlet wiederum bis zur Farblosigkeit. Die auf 700 ml abdestillierte methanolische Lösung wurde mit 350 ml vergälltem Äthylalkohol versetzt und 12 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Der dabei gebildete Niederschlag von gelblicher amorpher Beschaffenheit war schlecht zu filtrieren. Er wurde deshalb abzentrifugiert, in 400 ml warmem Methylalkohol gelöst und wiederum eine Fällung mit 200 ml Äthanol durchgeführt. Das erhaltene Produkt lösten wir dann in reinem Methanol (500 ml) und kristallisierten daraus das Saponin. Dann gaben wir den abzentrifugierten und getrockneten Niederschlag in einen kleinen Soxhlet und extrahierten 2 Stunden mit 250 ml Äther. Ein Teil der Verunreinigungen ging dabei in die Ätherlösung, die sich gelbbraunlich färbte. Der nicht extrahierbare Anteil wurde bei 70° C getrocknet. Wir erhielten schließlich 3,7 g weißes Saponin.

b) Darstellung des Sapogenins

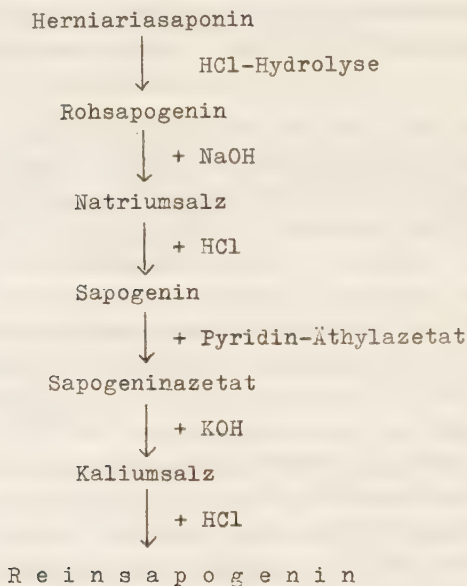
Wir lösten 3 g Herniariasaponin in 100 ml destilliertem Wasser und versetzten mit 100 ml 25%iger Salzsäure. Dann wurde 7 Stunden lang am Rückflußkühler hydrolysiert und die Lösung anschließend über Nacht in den Eisschrank gestellt.

Der schwärzlich gefärbte Niederschlag konnte abzentrifugiert, mit heißem destillierten Wasser bis zur Farblosigkeit gewaschen und der Rückstand bei 110° C getrocknet werden. Wir brachten nun das Sapogenin in einen kleinen Soxhlet, extrahierten 4 Stunden lang mit 300 ml Diäthyläther und entfärbten die braungefärbte ätherische Lösung des Sapogenins mit 0,2 g Aktivkohle. Mit 20 ml Normalnatronlauge ausgeschüttelt, bildete sich im Eisschrank ein halbfestes Natriumsalz. Dieses wurde abzentrifugiert, in 300 ml heißem Wasser gelöst und mit Salzsäure angesäuert. Dadurch bildete sich wiederum das freie Sapogenin zurück. Diese Reinigung über das Kaliumsalz wurde wiederholt. Wir nahmen schließlich das Sapogenin in 300 ml Äther auf, trockneten mit Natriumsulfat und dampften nach Filtration auf dem Wasserbad zur Trockene ein. Die Ausbeute betrug ca. 60 mg Sapogenin.

Die weitere Reinigung des Sapogenins erfolgte über das Azetylprodukt. 500 mg scharf getrocknetes Sapogenin wurden in 5 ml Pyridin gelöst und mit 4 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Dann stellten wir die Lösung in den Eisschrank. Am nächsten Morgen wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und das Azetylprodukt abgenutscht und getrocknet. Die Ausbeute betrug ca. 22 mg.

Wir lösten nun das Azetylsapogenin in 10 ml Methanol und versetzten mit einem geringen Überschuß von Normalkalilauge. In der Kälte bildete sich das Kaliumsalz des Sapogenins. Dieses wurde abzentrifugiert, in 5 ml Methanol gelöst und mit Salzsäure wiederum das freie Sapogenin abgeschieden. Die Endreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Äthanol-Wasser (6+4).

Schema der Sapogeningewinnung



6) Papierchromatographie der Saponine und Sapogenine

Die Papierchromatographie der Saponine und Sapogenine erfolgte im Lösungsmittelsystem Butanol-Eisessig-Wasser⁵⁵⁾. Nach dem Trocknen fluoreszierten sowohl das Saponin als auch das Sapogenin im UV-Licht schwach bläulich. Sie wurden zur weiteren Charakterisierung mit Blutlösung⁵⁶⁾ bzw. mit alkalischer natriummetaperjodathaltiger Kaliumpermanganatlösung besprüht.

- a) Durch Mischen von 20 ml defibriniertem Rinderblut mit 80 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde eine verdünnte Blutkörperchenaufschwemmung bereitet, Mit dieser Lösung besprühten wir die getrockneten Chromatogramme gleichmäßig und

55) N. L. DUTTA, Nature (London) 175, 85 (1955).

56) W. BUTZ, Pharmac. Acta Helvetiae 20, 296 (1945).

beobachteten nach 3-5 Minuten an Stelle der Saponinzonen weiße, genau begrenzte Höfe, die durch Hämolyse des Blutes zustandegekommen waren.

- b) Zur weiteren Charakterisierung verwendeten wir ein von N. L. DUTTA⁵⁷⁾ zum Saponinnachweis angegebenes Reagenz, für das folgende Zusammensetzung ermittelt wurde:

1,0 g Natriummetaperjodat
0,5 g Kaliumpermanganat
0,3 g Natriumhydroxyd in rotulis
100 g Aqua dest.

Mit dieser Lösung besprühten wir die Chromatogramme und entfernten nach 2 Minuten das überschüssige Kaliumpermanganat durch Waschen mit destilliertem Wasser. Die Saponine und Sapogenine zeigten sich als braune, beständige Flecken.

T a b e l l e 8

Chromatographie der Saponine und Sapogenine

System: Butanol-Eisessig-Wasser

	Sprühreagenzien	
	Rinderblut	alkohol. KMnO_4 - NaJO_3
R_F des Saponins	0,54	0,54
R_F des Sapogenins	0,94	0,94

- 7) Zur Konstitutionsaufklärung des Saponins und Sapogenins

a) Hämolyse

Zum Hämolyseversuch verwendeten wir frisches defibrinier-
tes Rinderblut. 20 ml davon wurden mit 80 ml einer von W. BUTZ⁵⁸⁾
vorgeschlagenen gepufferten isotonischen Kochsalzlösung folgen-
der Zusammensetzung verdünnt:

57) L. DUTTA, Nature (London) 175, 85 (1955).

58) W. BUTZ, Pharmac. Acta Helvetiae 20, 296 (1945).

sekundäres Natriumphosphat + 2 H ₂ O	0,395 g
primäres Kaliumphosphat	0,076 g
Natriumchlorid	0,720 g
Aqua dest. ad	100 g

Zu 5 ml dieser Blutlösung wurden 2 ml einer 1%igen Saponinlösung gegeben. Es trat innerhalb einer halben Minute Hämolyse ein, wobei die zunächst deckfarbige Blutkörperchenaufschwemmung innerhalb von 30 Sekunden zu einer durchsichtig lackfarbigen verändert wurde.

b) Farbreaktionen

1. Reaktion nach C. LIEBERMANN-BURCHARD⁵⁹⁾.

Ca. 10 mg Herniariasaponin lösten wir in 1 ml 40° C warmem Essigsäureanhydrid und gaben dazu 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure. Nach ca. 30 Sekunden färbte sich die Lösung rot, nach weiteren 60 Sekunden grün.

2. Reaktion nach T. KARIYONE und Y. HASHIMOTO⁶⁰⁾.

Zu 10 mg in einem Reagenzglas befindlichem Herniariasaponin gaben wir 4 Kriställchen Trichloressigsäure und brachten das Gemisch in ein siedendes Wasserbad. Es kam zu einer schwachen Rotfärbung, die sich bei weiterem schwachen Erwärmen über einer Mikroflamme (ca. 105-110° C) vertiefte.

c) Fällbarkeit mit Cholesterin

In einem Reagenzglas vermischten wir 5 ml einer 0,1%igen äthanolischen Saponinlösung mit 5 ml 1%iger äthanolischer Cholesterinlösung. Innerhalb von 3 Stunden kam es zu keiner Fällung.

d) Prüfung auf Hämolyseaufhebung durch Cholesterin

1 ml der unter c) erhaltenen Lösung brachten wir auf ein Rundfilter, trockneten dieses und besprühten mit verdünnter Blutlösung. Nach 2-3 Minuten kam es erneut zur Hämolyse (Bildung eines weißen Hofes).

59) C. LIEBERMANN-BURCHARD, Ber. dtsh. chem. Ges. 18, 1804 (1885).

60) T. KARIYONE u. Y. HASHIMOTO, Experientia (Basel) 9, 136 (1953).

e) Nachweis von Carboxylgruppen

10 mg Herniariasapogenin wurden in 60 ml Diäthyläther gelöst und mit 20 ml 5%iger Sodalösung ausgeschüttelt. Nach dem Ansäuern (Salzsäure) schieden sich weiße Flocken des Sapogenins ab.

f) Nachweis von Aldehydgruppen

α) Farbreaktion:

Wir gaben 5 mg Herniariasapogenin in ein trockenes Reagenzglas und übergossen mit ca. 3 ml fuchsin-schweiflicher Säure (Reagenz nach Schiff DAB 6). Der Bodensatz färbte sich dabei rotviolett.

β) Darstellung der Bisulfitverbindung:

5 mg Herniariasapogenin wurden in 5 ml Methanol gelöst und mit 5 ml einer mit Natriumbisulfit gesättigten methanolischen Lösung versetzt. Nach 24 Stunden konnten die gebildeten Kristalle abzentrifugiert werden.

g) Darstellung von Quillajasäure- und Herniariasapogeninacetat

5 mg Herniariasapogenin bzw. 5 mg Quillajasäure wurden in 2 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank verdünnten wir mit ca. 10 ml destilliertem Wasser und zentrifugierten die weißen Kristalle nach weiteren 24 Stunden ab.
Schmelzpunkte: Herniariasapogeninacetat 187°C , Quillajasäurediazetat $186\text{--}189^{\circ}\text{C}$.

h) UV-Spektren

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte im Unicam Quarz-Spektrophotometer SP 500 der Firma Unicam Instruments, Cambridge, England.

i) IR-Spektren

1060 γ Herniariasapogenin, 1020 γ Gypsogenin und 800 γ Quillajasäure wurden mit je 300 mg Kaliumbromid gemischt und in Form von Preßlingen im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 spektroskopiert.

L e b e n s l a u f

Am 17. November 1930 wurde ich, Walter Probst, in München geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich im Herbst 1941 in die Klenze-Oberrealschule in München ein und legte dort im Juni 1950 die Reifeprüfung ab. Anschließend ging ich als Praktikant in die Untere Stadtapotheke, Dillingen/Donau, und bestand im September 1952 in Augsburg die pharmazeutische Vorprüfung.

Zum Wintersemester 1952/53 wurde ich an der Universität München für das Pharmaziestudium zugelassen und schloß dieses im Herbst 1955 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen (Prädikat I) ab.

Im Frühjahr 1956 begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München die vorliegenden Untersuchungen.

